

**Einfluß von Kationen
auf die Sekundärstruktur
künstlicher und natürlicher Polynukleotide**

Rainer Herbeck

1974

Einfluß von Kationen
auf die Sekundärstruktur
künstlicher und natürlicher
Polynukleotide

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Rainer Herbeck
aus Kirchanschöring/Oberbayern

München 1974

1. Berichterstatter: Dozent Dr.G.Zundel

2. Berichterstatter: Prof.Dr.G.Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Mai 1974



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1969 bis Oktober 1972 im Physikalisch-Chemischen Institut der Universität angefertigt.

Herrn Dozent Dr. G. Zundel

der diese Arbeit anregte, möchte ich besonders herzlich für die vielen, wertvollen Diskussionen und sein großzügiges Entgegenkommen danken.

Herrn Prof. Böckh von der biologischen Fakultät der Universität Regensburg bin ich für die großzügige Hilfe bei der Isolierung der phenylalaninspezifischen tRNA zu großem Dank verpflichtet, ebenso wie Herrn Dr. P. Traub vom MPI für Zellbiologie in Wilhelmshaven für die Überlassung einer Probe von 23S rRNA aus *E. coli*.

Herrn A. Röhrich danke ich für die rasche und zuverlässige Beschaffung von Chemikalien, den Herren F. Reim und E. Rupp für die stets schnelle Ausführung feinmechanischer Arbeiten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Bundesrepublik Deutschland danke ich für die finanzielle Förderung.

Inhalt

Seite

1.0	Einleitung	1
2.0	Experimenteller Teil	5
2.1	Isolierung der tRNA ^{Phe} aus Hefe	5
2.1.1	Auswahl der geeigneten Methode	5
2.1.2	Isolierung der Aminoacylsynthetasen	7
2.1.3	Aminoacylierungstest	7
2.1.4	Auswertung des Elutionsprofils	8
2.2	Reinigung der Substanzen und Proben-herstellung	10
2.3	Beschreibung der IR-Meßküvette	12
2.4	Auswahl der Meßbereiche	15
2.5	Aufnahme der Spektren	17
2.6	Aufnahme der UV-Schmelzkurven	18
3.0	Untersuchungen am Poly (U)	20
3.1	Derzeitiger Wissensstand	20
3.2	Vergleich Mg ²⁺ -Poly (U) mit K ⁺ -Poly (U)	23
3.2.1	Schmelzkurven im UV	23
3.2.2	Der Bereich der Basenschwingungen 1800 - 1550 cm ⁻¹	24
3.2.3	Mögliche doppelhelikale Basenpaarungen des Mg ²⁺ -Poly (U)	25
3.2.4	Mögliche trippelhelikale Basenpaarungen des Mg ²⁺ -Poly (U)	26
3.2.5	Der Bereich der Schwingungen des Zucker-31 Phosphat-Rückgrats	31
3.3	Untersuchungen am Li ⁺ -Poly (U)	35
3.3.1	UV-Schmelzkurve	36
3.3.2	Der Bereich 1800 - 1550 cm ⁻¹	36
3.3.3	Banden des Zucker-Phosphat-Rückgrats	37

	Seite
4.0 Untersuchungen an der tRNA ^{Phe}	41
4.1 Derzeitiger Wissensstand	41
4.2 UV-Schmelzkurven	47
4.3 Temperaturabhängige Veränderungen im IR-Spektrum	49
4.4 Ionenabhängige Veränderungen im IR- Spektrum	55
5.0 Untersuchungen an 23S rRNA	63
5.1 Derzeitiger Wissensstand	63
5.2 Ionenabhängige Veränderungen im IR-Spektrum	66
5.3 Temperaturabhängige Veränderungen im IR-Spektrum	73
6.0 Zusammenfassung	79
Literatur	82

1.0 Einleitung

Die Trägerin der genetischen Information, die DNA gibt die in den Basentripletts gespeicherte Information über einen komplexen Übersetzungsmechanismus weiter in die Aminosäuresequenz der Proteine.

Im ersten Schritt dieser Informationsweitergabe, der sogenannten Transkription, wird an der DNA ein komplementärer Strang messenger RNA gebildet, wobei jedoch anstelle der Base Thymin Uracil verwendet wird. In der nun folgenden Translation wird die Nukleotidsequenz der mRNA in die Aminosäuresequenz der Proteine übertragen. Dabei sind spezifische Folgen von drei benachbarten Basen - das Codon - Erkennungszeichen zum Einbau einer speziellen Aminosäure in das Protein. Diese Translation erfolgt an den Ribosomen, submikroskopischen Partikeln von 150 - 200 Å Durchmesser, die zu etwa 65% aus Nukleinsäuren und zu 35% aus Proteinen bestehen. Die Aminosäuren sind über eine energiereiche Aminoacylbindung an das CCA-Ende einer transfer-Ribonukleinsäure gebunden. Für jede Aminosäure besteht mindestens eine spezifische tRNA. Die tRNA-Moleküle

Die Abkürzungen in dieser Arbeit sind nach den Vorschlägen der IUPAC-IUB: tRNA = transfer-Ribonukleinsäure; tRNA^{Phe} = phenylalaninspezifische tRNA; DNA = Desoxyribonukleinsäure; rRNA = ribosomale Ribonukleinsäure; mRNA = messenger-Ribonukleinsäure; A = Adenin; U = Uracil; C = Cytidin; G = Guanin; Poly (U) = Polyuridylsäure, entsprechend Poly (A), Poly (C) und Poly (G); RNase = Ribonuklease.

haben eine Kettenlänge von etwa 75 - 80 Nukleotiden. Ihre Funktion im Translationsmechanismus läßt erwarten, daß die tRNA Erkennungsregionen für die Wechselwirkung mit der Aminoacyl-tRNA-Synthetase, dem Ribosom und der mRNA besitzt.

Eine zentrale Bedeutung in diesem Mechanismus kommt dabei der Aminoacyl-tRNA-Synthetase zu. An diesem für jede Aminosäure und für jede tRNA spezifischen Enzym wird die energiereiche Bindung zwischen der tRNA und der Aminosäure gebildet, wobei die Hydrolyse eines ATP-Moleküls die Energie liefert. Die gebildete Aminoacyl-tRNA bindet dann an den mRNA-Ribosom-Komplex, an dem die Peptidkette wächst. Entscheidend ist dabei die Erkennung des Codons an der mRNA durch das Anticodon der tRNA. Die tRNA der zuvor eingebauten Aminosäure ist noch an das Polysom gebunden und wird durch einen nukleophilen Angriff der α -Aminogruppe der neueinzubauenden Aminosäure auf die Esterbindung freigesetzt, wobei die neue Peptidbindung geknüpft wird.

Es ist nun schon lange bekannt, daß diese enzymatischen Reaktionen mit Nukleinsäuren für ihren molekularen Ablauf unbedingt Mg^{2+} -Ionen benötigen (1) (2). Es gibt viele Beispiele, daß Mg^{2+} -Ionen die Konformation von Nukleinsäuren verändern. So ist schon seit etwa 15 Jahren bekannt, daß Mg^{2+} -Ionen die Konformation von DNA stabilisieren (3) (4); daß Mg^{2+} -Ionen zum Aufbau der Ribosomen aus kleineren Untereinheiten erforderlich sind, wurde vor etwa 10 Jahren erkannt (5) - (9); und kürzlich wurde festgestellt, daß Mg^{2+} -Ionen die Kooperativität der Struktur von tRNA erhöhen (10) - (12); auch bei künstlichen Polynukleotiden induzieren Mg^{2+} -Ionen spezielle Konformationen wie z. B. bei Poly (U) im Falle tiefer Temperaturen (13).

Aufgrund ihrer konduktometrischen Messungen postulierten Shack et al. (14) sowie Zubay und Doty (15) eine Bindungsstelle erster Art für Mg^{2+} -Ionen an Nukleinsäuren. Sie fanden bei ihren Titrationen an DNA einen Pseudo-Endpunkt bei einem Verhältnis von 0,2 Mg^{2+} -Ionen pro Phosphatgruppe. Felsenfeld und Huang jedoch (16) (17) erhielten zusätzlich zum Pseudo-Endpunkt einen zweiten Endpunkt, der mit dem erwartenden stöchiometrischen Verhältnis übereinstimmte. Deshalb postulierten diese Autoren, daß die Mg^{2+} -Ionen an die Phosphatgruppen und nicht an die Basenreste gebunden werden. Der Pseudo-Endpunkt der konduktometrischen Titrationen konnte bis heute nicht erklärt werden.

Neuere Ergebnisse von Römer et al. (18) an spezifischen tRNAs führen jedoch wiederum zu dem Schluß, daß es an den tRNAs verschiedene Arten von Bindungsplätzen für Mg^{2+} -Ionen gibt und daß die Mg^{2+} -Ionen die Tertiärstruktur der Moleküle entscheidend beeinflussen.

Die Ergebnisse aller zitierten Arbeiten erlauben zwar den Schluß, daß die Mg^{2+} -Ionen einen Einfluß auf die Konformation der Nukleinsäuren haben, geben aber keine konkreten Hinweise auf ihre Wirkungsweise. Eine erfolgversprechende Methode zur Aufklärung dieser Frage ist die IR-Spektroskopie mit ihren differenzierten Aussagen über die verschiedenen Gruppierungen der Nukleinsäuren.

Schon lange ist bekannt, daß im Bereich der Valenzschwingungen der Basenreste ($1800 - 1500 \text{ cm}^{-1}$) Aussagen über das Ausmaß der Basenpaarung gemacht werden können (19) - (21). Durch die Wasserstoff-Brücken-Bindungen werden die Basen in eine Konfiguration gebracht, in der die Übergangsmomente verschiedener Schwingungen parallel sind und damit koppeln. Dies resultiert in Bandenaufspaltungen und Verschiebung in entgegengesetzter Richtung.

Die Arbeiten von Lubos (22) und insbesondere Kölkenbeck (23) zeigten jedoch, daß auch im Bereich der Schwingungen des Rückgrats in Abhängigkeit vom Ionenmilieu solche Kopplungen auftreten können. Das Schmelzen des Rückgrats wurde bereits von Tschirgadze et al. (24) an Hand von Veränderungen in diesem Bereich studiert.

Inhalt dieser Arbeit soll es sein, diese Erkenntnisse, die an künstlichen Polynukleotiden gewonnen wurden, auf natürliche Polynukleotide anzuwenden und zur Erhöhung der biologischen Relevanz der Aussagen die Messungen in wässriger Lösung statt in hydratisierten Filmen auszuführen.

2.0 Experimenteller Teil

2.1 Isolierung der tRNA^{Phe} aus Hefe

2.1.1 Auswahl der geeigneten Methode

Die IR- und UV-Messungen an tRNA sollten von reinem, molekular einheitlichem Material ausgehen, dessen Primärstruktur bereits bekannt ist. Zur Reindarstellung einzelner Spezies aus dem Gemisch der etwa 20 tRNAs sind verschiedene Verfahren entwickelt worden. Als besonders geeignet erwiesen sich dabei die Verfahren der Gegenstromverteilung (25) - (27) zur Gewinnung größerer Mengen spezifischer tRNA und das Verfahren der Säulenchromatographie. Gillam et al. (28) beschreiben eine säulenchromatographische Methode an benzoylierter Diäthylaminoäthylcellulose (BD-Cellulose), die für meine Zwecke besonders geeignet erschien. Das durch die Benzoylierung stark hydrophobe Säulenmaterial hält beim Waschen mit einer wässrigen Lösung, die $1,0 \text{ m NaCl}/10^{-2} \text{ m MgSO}_4$ enthält, lediglich die hydrophobste tRNA^{Phe} fest.

Ursache dieser Hydrophobizität ist die hydrophobe Nukleinbase Y, deren Struktur noch nicht bekannt ist. Es ist überraschend, daß diese Gruppe, die im Vergleich zum ganzen Molekül sehr klein ist, einen wesentlichen Einfluß auf die Eigenschaften der tRNA ausübt. Dies kann dadurch erklärt werden, daß der hydrophobe Rest an einer exponierten Stelle des sonst recht kompakten Moleküls lokalisiert ist. Y befindet sich in der Anticodonregion der tRNA^{Phe} (Abb. 1).

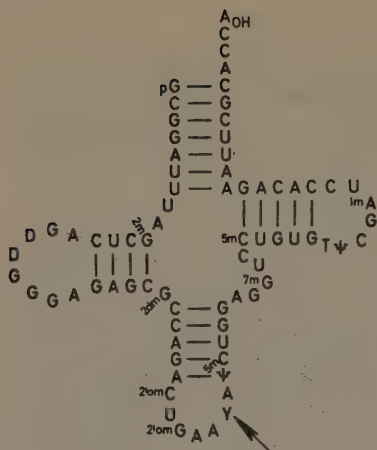


Abb. 1: Kleeblattmodell für $tRNA^{Phe}$ aus Hefe nach RajBhandary et al. (29).

Die Elution der $tRNA^{Phe}$ erfolgt erst beim Waschen mit 1,0 m NaCl-Lösung, die 10% Äthylalkohol enthält.

3,5 g tRNA aus Bäckerhefe (Biochimica Böhringer, Mannheim) wurden in 50 ml 0,9 m NaCl/ 10^{-2} m $MgSO_4$ gelöst. Zur Entfernung eventuell vorhandener Nukleasen wurde die Lösung mit frisch destilliertem, mit H_2O gesättigtem Phenol extrahiert. Gelöstes Phenol wurde mit peroxid-freiem Äther herausgewaschen.

Danach wurde die Lösung auf die BD-Cellulose aufgetragen. Das Säulenmaterial befand sich in einem etwa 80 cm langen Glasrohr mit einem Innendurchmesser von 5 cm. Die Nukleinsäurelösung und später das Elutionsmittel (0,9 m NaCl/ 10^{-2} m $MgSO_4$) wurden mit Hilfe einer Schlauchpumpe mit leichtem Überdruck durch die Säule gepumpt. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug etwa 1 ml/min.

Das Eluat wurde in Fraktionen von 20 ml aufgefangen, deren Konzentration an tRNA ständig durch die Extinktion bei 260 m μ bestimmt wurde. Eine OD von 25 entspricht dabei 1 mg tRNA/ml. Gleichzeitig wurde die tRNA-Rohlösung

und jede 10. Fraktion einem Aminoacylierungstest mit radioaktiv markiertem Phenylalanin unterzogen. Die dazu erforderlichen Aminoacylsynthetasen wurden auf folgendem Weg hergestellt:

2.1.2 Isolierung der Aminoacylsynthetasen

Etwa 25 g Bäckerhefe wurden zweimal mit 0,05 m Trishydroxymethylaminomethan-HCl, pH 7,5 (Tris-HCl), 1 mM Dithioerythrit (DTE) gewaschen und dann in etwa 200 ml dieses Puffers suspendiert. Diese Suspension wurde in der sog. French-Press kurzzeitig einem sehr hohen Druck ausgesetzt (20 000 psi) und dann bei 20 000 rpm eine Stunde zentrifugiert. Der Überstand über den Zelldebris, der die gewünschten Enzyme enthält, wurde 30%ig an destilliertem Glycerin gemacht und bei -20°C aufbewahrt.

2.1.3 Aminoacylierungstest

Für die Beladung der tRNA mit radioaktiv markiertem Phenylalanin wurde folgender Reaktionsansatz gemacht:

0,025 ml $4 \cdot 10^{-2}$ m Na^+ -ATP, pH 7,5
 0,025 ml $2 \cdot 10^{-4}$ m ^3H -C-Phenylalanin (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{M}$)
 0,025 ml TMK, pH 7,5 (1 m Tris, 0,1 m MgSO_4 , 0,1 m KCl)
 0,01 ml 0,1 m Glutathion
 0,01 ml BSA (5 mg/ml)
 0,1 ml fraktionierte tRNA
 0,01 ml Rohenzym nach 2.1.1

Dieser Ansatz wurde im Eisbad gemischt, mit H_2O auf ein Endvolumen von 0,25 ml gebracht und anschließend im Wasserbad 10 min. bei 28°C inkubiert. Danach wurde das Reaktionsgemisch im Eisbad auf 0°C abgekühlt und die tRNA mit 2 ml 10%iger Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt. Nach einer halben Stunde wurde das Präzipitat auf einen Filter (Whatman) gesammelt, mit 10 ml TCA und 5 ml Äthanol gewaschen und 15 min. unter einem IR-Strahler getrocknet. Das Filtermaterial (Glasfaser) hat die Eigenschaft, daß es die tRNA festhält, während die nicht veresterte Aminosäure ausgewaschen wird. Die Zählung der counts erfolgte in einem Szintillationszähler.

2.1.4 Auswertung des Elutionsprofils

Abb. 2a zeigt das Elutionsprofil. Die tRNA kam etwa ab der 10. Fraktion, zuerst relativ konzentriert. Die OD nahm dann bis zur 280. Fraktion stetig ab. Das Eluat war bisher frei von tRNA^{Phe}, wie die Einbautests zeigen. Ab der 280. Fraktion wurde der Elutionslösung durch einen Gradientenmischer sukzessiv Äthanol zugesetzt, um den hydrophoben Charakter zu erhöhen. Die Konzentration an tRNA stieg wieder an. Die tRNA^{Phe} kam erst relativ spät bei einem Äthanolgehalt von etwa 7% und war auf rund 75 Fraktionen verteilt. Dabei wurde jede 3. Fraktion einem Einbautest unterzogen. Der Verlauf der OD und die Einbautests zeigen, daß die tRNA^{Phe}, vermutlich infolge Schlierenbildung, nicht einheitlich von der Säule gewaschen wurde.

Deshalb wurden alle Fraktionen, die tRNA^{Phe} enthielten (360 - 435), vereinigt und erneut auf eine BD-Cellulose-Säule aufgebracht. Elutionsmittel war diesmal ein Gradient zwischen 1,0 m NaCl/10⁻² m MgSO₄ und 1,0 m NaCl/10⁻² m MgSO₄/10% 2-Methoxyäthanol. Ein Aminoacylierungstest wurde bei jeder 3. Fraktion durchgeführt. Elutionsprofil und Einbautests (Abb. 2b) kann man entnehmen, daß die tRNA^{Phe} innerhalb von 58 Fraktionen einheitlich eluiert wurde. Aus den vereinigten Fraktionen 26 - 84 wurde die tRNA^{Phe} mit derselben Menge eiskalten Äthanol ausgefällt, abzentrifugiert und in 30 ml H₂O aufgenommen. Die Konzentration an tRNA war 2,5 mg/ml, bestimmt aus der Extinktion. Ein Aminoacylierungstest ergab 2,3 mg/ml, d. h. die phenylalaninspezifische tRNA war zu etwa 92% rein. Die Lösung wurde bei -25°C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

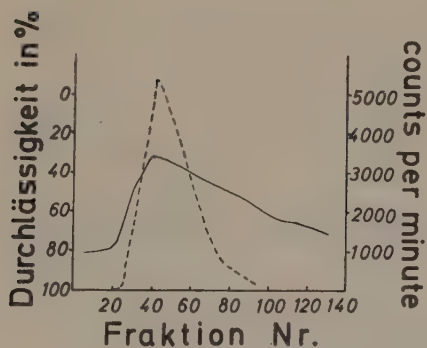
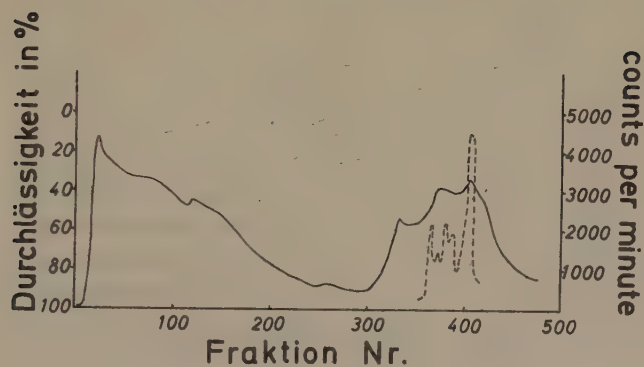


Abb. 2: Elutionsprofile der $tRNA^{Phe}$ aus Hefe
 ————— Durchlässigkeit bei 260 m μ
 - - - - - counts per minute

2.2 Reinigung der Substanzen und Probenherstellung

Zur spektroskopischen Untersuchung sollten die Polynukleotide in einem genau definierten Ionenmilieu vorliegen. Das Poly (U) der Firma Böhringer, Mannheim, die tRNA^{Phe} wie auch die 23S rRNA, die freundlicherweise von Herrn Dr.P.Traub, Max Planck Institut für Zellbiologie, Wilhelmshaven, zur Verfügung gestellt wurde, lagen jedoch als Salze verschiedener ein- und zweiwertiger Kationen vor. Riesner (30) beschreibt eine speziell an tRNAs erprobte Reinigungsmethode, die ich leicht modifiziert auf alle meine Substanzen anwendete. Die Polynukleotide wurden mit einer Konzentration von etwa 3 mg/ml in bidestilliertem Wasser gelöst. Poly (U) und tRNA^{Phe} lösten sich sehr gut, während die 23S rRNA 12 Stunden bei 0°C geschüttelt werden mußte, um eine homogene Lösung herzustellen. Die genaue Konzentrationsbestimmung erfolgte durch die Messung der Extinktion bei 260 m μ , bei Poly (U) 261 m μ . Dabei entspricht bei der tRNA^{Phe} und bei der rRNA die optische Dichte 25 einer Konzentration von 1 mg/ml, bei Poly (U) gilt: 21 OD = 1 mg/ml.

Die Reinigung erfolgte anschließend durch die folgende Reihe von Dialysen:

- 2 x 6 Stunden gegen 0,1 m KCl, 5 mM EDTA
- 1 x 12 Stunden gegen bidestilliertes Wasser
- 2 x 6 Stunden gegen 0,01 mKakodylatpuffer,
pH 6,8, der das jeweilige Kation in der gewünschten Konzentration enthielt.

Die Dialyseschläuche wurden vor Gebrauch einmal 1 Std. mit 5mM EDTA-Lösung und mehrere Male 15 min. mit bidestilliertem H₂O ausgekocht und unter H₂O im Kühlschrank aufbewahrt. Alle Dialysen wurden bei 0°C in einem Eisbad in einer Schüttelmaschine ausgeführt. Der Gehalt der so

gereinigten Proben an zweiwertigen Kationen, insbesondere an Mg^{2+} , wurde mehrmals mit Hilfe der Atomabsorption überprüft. Dabei lag der Wert an Mg^{2+} nie über $1,5 \cdot 10^{-3}$ mg/ml, der an anderen zweiwertigen Kationen noch darunter. Das ergibt bei den tRNA^{Phe} -Proben einen Gehalt von etwa einem Mg^{2+} -Ion pro tRNA^{Phe} -Molekül, bei den anderen Nukleotiden mit höherem Molekulargewicht entsprechend mehr.

Riesner (30) gibt einen ähnlichen Wert an. Die Atomabsorptionsanalysen wurden freundlicherweise von der Bundesanstalt für Strahlenschutz in Neuherberg und von der Firma Beckmann Instruments, München, durchgeführt.

Zur Herstellung der D_2O -Lösungen wurde 1 ml der Probenlösung in einem Vakuum von etwa 10^{-2} torr über eine mit flüssigem Stickstoff gekühlte Falle lyophilisiert und anschließend in einer wasserdampffreien glove-box in derselben Menge D_2O wieder aufgelöst. Dieser Prozeß wurde noch zweimal wiederholt. Zur Messung wurden die Proben in der glove-box in die Meßküvette pipettiert und verschlossen.

Alle Gefäße und Geräte, die mit den Lösungen in Berührung kamen, wurden, sofern möglich, 6 Stunden bei 200°C sterilisiert.

Die Lösungen mit Poly (U) und tRNA^{Phe} wurden bei -15°C eingefroren, die 23S rRNA wurde stets sofort vermessen, da sie beim Einfrieren vermutlich in Bruchstücke zerfällt. Bei allen Operationen mit den Lösungen wurden sterile Einmalhandschuhe getragen.

2.3 Beschreibung der IR-Meßküvette

Im Prinzip wurde die von Hofmann und Zundel (31) beschriebene Küvette verwendet. Sie mußte jedoch für meine speziellen Messungen in einigen Punkten geändert werden (Abb. 3).

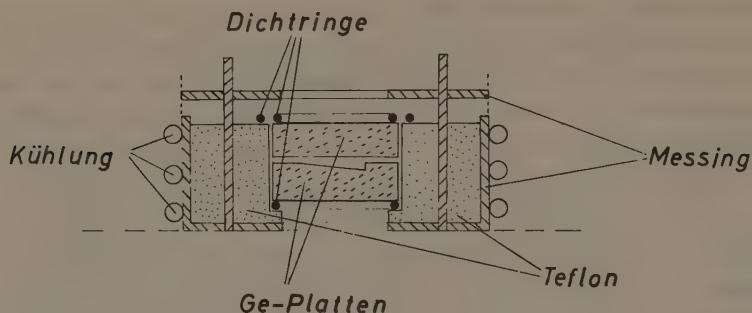


Abb. 3: IR-Küvette mit konstanter Schichtdicke

1. Das Küvettenmaterial mußte widerstandsfähig gegen höhere Temperaturen (90°C) sein. Der Innenraum wurde deshalb aus Teflon statt wie bisher aus Zweikomponentenkleber gearbeitet.
2. Die Fenster aus polykristallinem Germanium wurden vor jeder Messung 5 Stunden bei 200°C sterilisiert und waren deshalb herausnehmbar.
3. Da einige Messungen bei 90°C ausgeführt wurden und der Probenraum auch bei diesen Temperaturen einwandfrei abgedichtet werden mußte, wurden Dichtringe aus temperaturbeständigem Viton verwendet.

4. Einzelne Messungen erforderten eine genaue Kenntnis der Temperatur im Probenraum. Es genügte daher nicht die nur ungenaue Temperaturangabe des Thermostatbades. Die Temperaturmessung erfolgte über einen Platin-Widerstandsfühler der Degussa-Werke, Hanau, der aufgrund seiner Ausmaße ($l = 2 \text{ cm}$, $d = 2 \text{ mm}$) direkt neben dem Probenraum in das Küvettenmaterial einge-lassen werden konnte. Die Temperaturregelung erfolgte mittels eines an diesen Temperaturfühler angeschlossenen Ultrathermostaten mit Relaisbox des Meßgerätewerks Lauda. Die Temperatur konnte so auf $0,1^{\circ}\text{C}$ genau ein-gestellt werden.
5. Wegen der Gefahr der Assoziation war die Konzentration an Polynukleotiden bei allen Messungen möglichst gering (etwa 3 mg/ml). Die mittlere Dicke des zur Vermeidung von Interferenzen keilförmigen Schliffs (32) in der einen Germaniumplatte mußte deshalb sehr viel größer werden. Sie betrug $0,05 \text{ mm}$. Bisher waren etwa $0,01 \text{ mm}$ üblich. Zusätzlich mußte die Ordinate der Spektren fünffach gedehnt werden. Bei der starken Verdünnung maskieren die Banden des jeweiligen Lösungsmittels (H_2O oder D_2O) die interessierenden Banden der Polynukleotide. Um dies zu vermeiden mußte in den Vergleichsstrahl eine Küvette gebracht werden, die eine adäquate Menge reinen Lösungsmittels enthielt. Dies geschah mit Hilfe der von Kampschulte-Scheuing (33) (Abb. 4) beschriebenen Flüssig-keitsküvette mit variabler Schichtdicke. Sie wurde vor jeder Messung so eingestellt, daß die Banden des Lösungsmittelspektrums genau kompensiert wurden. Bei höheren Temperaturen änderte sich die Schichtdicke der ganz aus Metall gearbeiteten Vergleichsküvette und mußte nachgestellt werden. Diese Technik ist nicht über den gesamten IR-Spektralbereich anwendbar (vgl. 2.4)

Als besondere Schwierigkeit erwies es sich, Germanium-Plattenpaare zu finden, deren optische Eigenschaften (Absorption, Reflexion, Streuung) so gut übereinstimmten, daß sich auch bei fünffacher Dehnung noch gute Nulllinie ergaben.

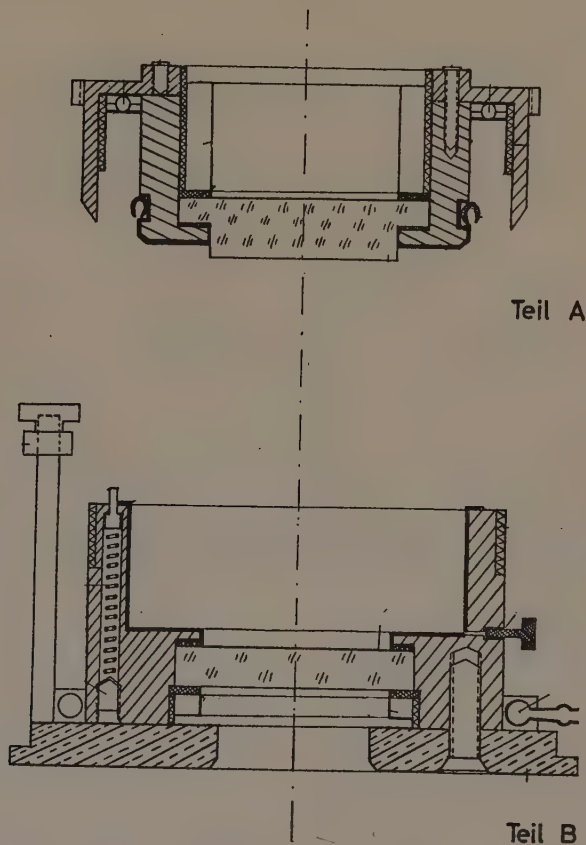


Abb. 4: Flüssigkeitsküvette mit variabler Schichtdicke nach Kampschulte-Scheuing (33)

2.4 Auswahl der Meßbereiche

Wie bereits in 2.3 erwähnt, wurde das Lösungsmittel für die Polynukleotide im Vergleichsstrahl kompensiert, um nicht verzerrte Spektren zu erhalten. Diese Methode ist nun aber nicht über dem gesamten Bereich des benutzten IR-Spektrographen anwendbar. Abb. 5 zeigt die IR-Spektren von reinem H_2O und D_2O bei 50 μ Schichtdicke.

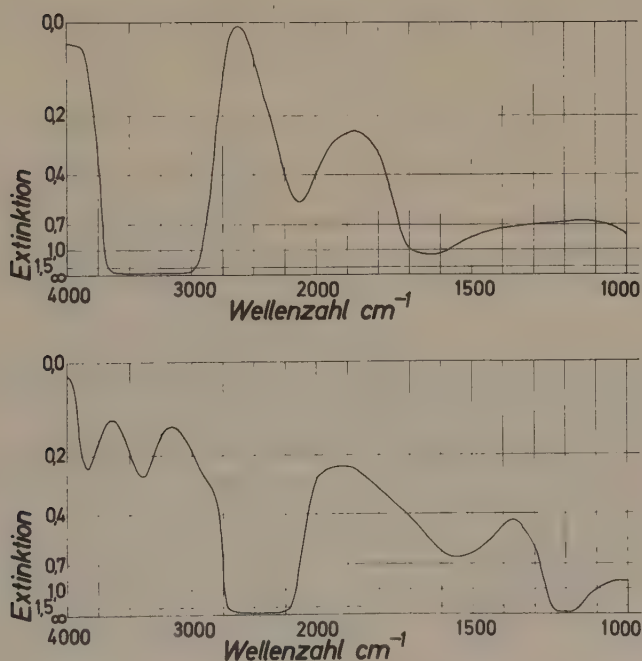


Abb. 5: IR-Spektren von H_2O (oben) und D_2O (unten), Schichtdicke 50 μ .

Bei sehr starken Absorptionen sind die Energieverluste so groß, daß die den Detektor (Thermoelement) erreichende Restenergie nicht mehr ausreicht zur Aufzeichnung der Spektren. Dies ist der Fall in folgenden Bereichen:

1. H_2O : 3750 - 2900 cm^{-1} OH-Valenzschwingung
 1700 - 1550 cm^{-1} H_2O -Scherenschwingung
 ab 1000 cm^{-1} H_2O -Torsionsschwingung
2. D_2O : 2800 - 2200 cm^{-1} OD-Valenzschwingung
 1250 - 1150 cm^{-1} D_2O -Scherenschwingung

Von den interessierenden Bereichen waren also folgende zugänglich:

1. H_2O : 1350 - 1000 cm^{-1} : Die Banden der symmetrischen und antisymmetrischen PO_2^- -Valenzschwingungen (1080, 1240 cm^{-1}) der glycosidischen C-N-Schwingung (1300 cm^{-1}) und die antisymmetrische C-O-C-Valenzschwingung der Ribose (1070 cm^{-1}).
2. D_2O : 1800 - 1550 cm^{-1} : Banden der Valenzschwingungen der Basenreste
 1150 - 1000 cm^{-1} : Zwei Banden des Riboserests, und zwar die antisymmetrische C-O-C-Valenzschwingung (1070 cm^{-1}) und die 2'-OD-Deformationsschwingung (1050 - 1000 cm^{-1}) und die symmetrische PO_2^- -Valenzschwingung (1080 cm^{-1}). Dazu kommt noch eine Skelettschwingung der Ribose bei 1130 cm^{-1} .

2.5 Aufnahme der Spektren

Die Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer Doppelstrahlspektrographen, Modell 325, aufgenommen. Zuerst bereiteten dabei die starken Energieverluste durch die Absorption der Lösungsmittelschichten in Meß- und Vergleichsstrahl Schwierigkeiten. Obwohl das Gerät mit einer Restenergie von 1% der eingestrahelten Energie noch zufriedenstellend arbeitet, mußte mit dem maximalen Spaltprogramm 8 gemessen werden. Die damit verbundene Verschlechterung der Auflösung spielt bei Spektren in wässriger Lösung keine Rolle, da die Auflösung auch dann noch 1 cm^{-1} beträgt. Die Verstärkung war 3,5, die Ordinate wurde fünf-fach gedehnt. Das bei diesen hohen Werten auftretende starke Untergrundrauschen des Geräts mußte mit der hohen Zeitkonstanten 6 gedämpft werden. Wegen der dadurch hervorgerufenen Unempfindlichkeit der Feder konnten die Spektren nur sehr langsam mit einer Geschwindigkeit von einer Wellenzahl pro 10 sek. aufgenommen werden. Außerdem konnte nur gemessen werden, wenn die Trockenluftspülung des IR-Geräts frisch regeneriert und die Luft daher praktisch wasserdampf-frei war. Schon nach vier Stunden Messung waren die Inkompensationen durch Wasserdampf zu stark. Die Empfindlichkeit des Geräts wurde während der Messung mehrfach überprüft und war lediglich in den Spektren mit H_2O als Lösungsmittel im Wellenzahlenbereich kurz vor 1000 cm^{-1} (etwa $1020 - 1000 \text{ cm}^{-1}$) nicht voll zufriedenstellend.

2.6 Aufnahme der UV-Schmelzkurven

Zur genauen Bestimmung der Schmelzpunkte wurden von den Salzen des Poly (U) und der tRNA^{Phe} UV-Schmelzkurven aufgenommen. Beobachtet wird dabei die Hyperchromizität, d. h. die Zunahme der Absorption bei der Zerstörung der Sekundärstruktur. Bei kooperativen Schmelzvorgängen ergeben sich im Temperatur-Absorptions-Diagramm Kurven mit sehr großem Absorptionsanstieg in einem sehr schmalen Temperaturintervall.

Insbesondere wollten wir Auskunft darüber, ob temperaturabhängige Veränderungen im IR-Spektrum sich auch in dem UV-Spektrum äußern. Beide Beobachtungen müssen nicht parallel verlaufen, da nur Veränderungen in der Wechselwirkung der Basen untereinander sich in einer Veränderung der Hyperchromizität äußern.

Da wir die Polynukleotide im UV und im IR unter völlig identischen Bedingungen untersuchen wollten, wurden vor der IR-Messung 0,2 ml der Probe entnommen. Wegen der hohen optischen Dichte der Lösungen - sie lag zwischen 70 und 140 - mußte eine Meßküvette mit sehr kleiner Weglänge verwendet werden, da der günstigste Meßbereich des verwendeten UV-Spektrophotometers PMQ II der Firma Zeiss zwischen 0,1 und 1,0 OD liegt.

Die Probenlösung wurde in den 0,1 mm dicken Probenraum der verwendeten QU-Quarzküvetten der Firma Hellma einpipettiert und mit dem Deckfenster verschlossen. Die beiden Fenster waren zuvor fünf Stunden bei 200°C sterilisiert worden. Die Nut zwischen den beiden Fenstern wurde mit Silikonfett gefüllt, um den Probenraum wasserdampfdicht abzuschließen. In der Vergleichsküvette befand sich dieselbe Menge reinen Lösungsmittels. Zur Messung waren die Küvetten in einem thermostatisierbaren Küvettenhalter der Firma Zeiss. Die Temperaturmessung

erfolgte über einen Platinwiderstand (siehe 2.3), der in einen genau in einen Probenraum des Küvettenhalters passenden Messingblock eingelassen war. Die Temperaturregelung erfolgte, wie in 2.3 beschrieben, mit einem Lauda-Ultrathermostaten. Die Temperaturdifferenz zwischen zwei Bestimmungen der Absorption betrug normalerweise 2°C , bei den steilen Schmelzkurven der sehr kooperativen Strukturen des Mg^{2+} -Poly (U) und des Mg^{2+} -Salzes der tRNA^{Phe} $0,4^{\circ}\text{C}$. Vor jedem Meßpunkt wurden 0 und 100% Durchlässigkeit genau eingestellt. Bei den Messungen mit Poly (U) bei tiefen Temperaturen wurde der Probenraum mit trockenem Stickstoff gespült, um ein Beschlagen der Fenster zu vermeiden.

3.0 Untersuchungen am Poly (U)

3.1 Derzeitiger Wissensstand

Sehr viele Arbeiten über Poly (A), auch über die Helices zwischen Poly (A) und Poly (U), aber nur vergleichsweise wenige über Poly (U) deuten die Schwierigkeiten bei der Handhabung dieser Substanz an. Sie ist ungleich empfindlicher gegen Ribonukleasen als alle anderen Homoribopolynukleotide, was bereits andeutet, daß keine Sekundärstruktur vorliegt, die sterisch vor dem Angriff des Enzyms schützt.

Richards et al. (34) fanden zwischen 25°C und 80°C keine Hyperchromizität, d. h. es besteht oberhalb von 25°C keine Stapelung der Basen. Die Ergebnisse von Small und Peticolas (35), die das Poly (U) mit Hilfe der Ramanspektroskopie untersuchten, zeigen, daß oberhalb von 20°C keinerlei Veränderungen in den Schwingungen der Basenreste auftreten, was in diesem Temperaturintervall die Bildung einer über Wasserstoffbrücken verknüpften Helix ausschließt.

Eine Erklärung für das besondere Verhalten des Poly (U) liegt in dem Uracil-Molekül (Abb. 6).

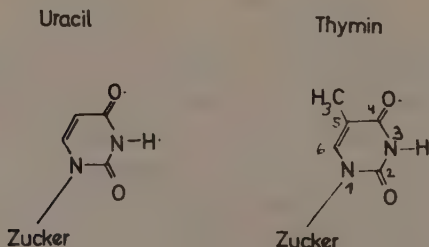


Abb. 6: Uracil und Thymin.

Das relativ kleine π -Elektronensystem und die durch den mesomeren und induktiven Effekt der beiden Carbonylsauerstoffatome geringe Elektronendichte begünstigen weniger eine Stapelung der Basen.

In diese Vorstellung passen die Untersuchungen von Szer und Ochoa (36). Da sowohl UUU als auch TTT das Codon für den Einbau von Phenylalanin sind, untersuchten sie, inwieweit Poly (U) und Poly (rT) als Matrix dienen können. Sie fanden, daß Poly (U) bei Raumtemperatur sehr gut Poly-L-Phenylalanin synthetisiert, während Poly (rT) erst oberhalb von 36°C dazu in der Lage ist. Poly (rT) hat im Gegensatz zu Poly (U) bis 36°C eine Sekundärstruktur. Deshalb kann Poly (rT) aus sterischen Gründen nicht an dem Mechanismus der Proteinbiosynthese teilnehmen. Da sich Poly (U) und Poly (rT) nur durch die CH_3 -Gruppe am C(5) des Pyrimidinrings (Abb. 6) voneinander unterscheiden, muß darin der Grund für die unterschiedlichen Eigenschaften zu finden sein.

Es ist leicht einzusehen, daß die hydrophobe $-\text{CH}_3$ -Gruppe das hydrophobe Stapeln der Basen ermöglicht. Dazu kommt noch der hyperkonjugative Effekt der $-\text{CH}_3$ -Gruppe, der die Elektronendichte im Ring erhöht. Dies erleichtert die hydrophobe Wechselwirkung zwischen den π -Elektronensystemen der Basen und erhöht gleichzeitig beträchtlich die Dispersionswechselwirkung. Das Zusammenwirken dieser Faktoren bewirkt die Sekundärstrukturbildung beim Poly (rT).

Es ist daher zu erwarten, daß Poly (U) erst bei hohen Ionenstärken (zur Abschirmung der negativen Ladungen der Phosphatgruppen) und bei tiefen Temperaturen eine Sekundärstruktur ausbildet. Dies ist von mehreren Autoren bestätigt worden. So fanden Richards et al. (34) und Szer (37), daß Poly (U) in Gegenwart von $0,1 \text{ m Mg}^{2+}$ eine sehr kooperativ

schmelzende Sekundärstruktur mit einem Schmelzpunkt von etwa 8°C ausbildet. Thrierr et al. (38) erhielten in 0,5 m CsCl eine weit weniger kooperativ schmelzende Sekundärstruktur mit höherem Schmelzpunkt. Dieselben Autoren konnten mit Hilfe der Lichtstreuung zeigen, daß sich das Molekulargewicht beim Übergang vom geordneten in den ungeordneten Zustand nicht ändert, d. h. die Sekundärstruktur ist keine intermolekulare Helix sondern wird von den monomeren Poly (U) Molekülen aus- gebildet. Willemsen und Van Os (39) untersuchten die spezielle Bindung von Mg^{2+} -Ionen an Poly (U) und fanden, daß die maximale Sekundärstrukturbildung erst eintritt, wenn etwa 10 Mg^{2+} pro Phosphat vorhanden sind. Spezifisch gebunden wird jedoch nur 1 Mg^{2+} pro 2 Phosphatgruppen mit einer Bindungskonstante $K = 3 \cdot 10^4$. Die anderen Mg^{2+} -Ionen dienen primär der Abschirmung der negativen Ladungen des Rückgrats.

Rabczenko und Shugar (40) postulierten eine Doppel- helix als Mg^{2+} induzierte Sekundärstruktur mit den Möglichkeiten der U-U-Basenpaarung der Abb. 7.

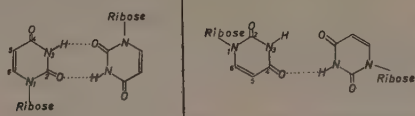


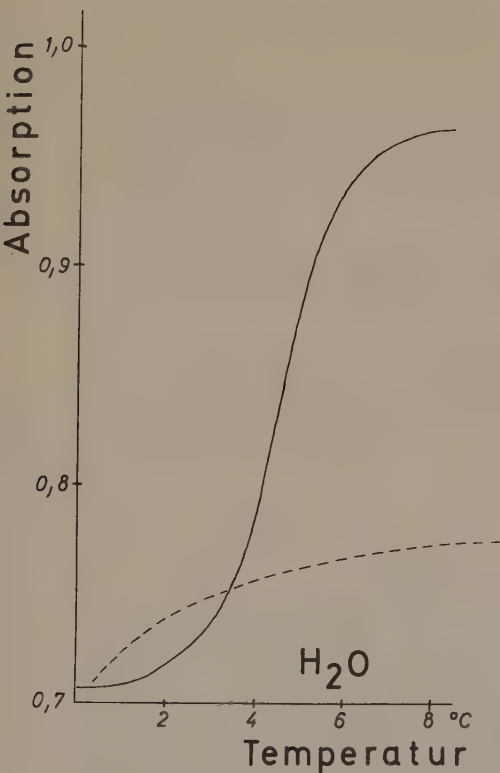
Abb. 7: Mögliche U-U-Basenpaarungen nach (40).

Bode et al. (41) schließen aufgrund ihrer IR-Ergebnisse die Möglichkeit (a) aus und postulieren unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Thrierr et al. (38) eine intramolekulare Doppelhelix des in sich selbst zurückge- falteten Poly (U) Moleküls.

3.2 Vergleich Mg^{2+} -Poly (U) mit K^+ -Poly (U)

3.2.1 Schmelzkurven im UV

Abb. 8a zeigt das Absorptions-Temperaturdiagramm des Mg^{2+} -Poly (U) und des K^+ -Poly (U) in H_2O und Abb. 8b dasselbe Diagramm des Mg^{2+} -Poly (U) in D_2O bei 261 m μ .



a

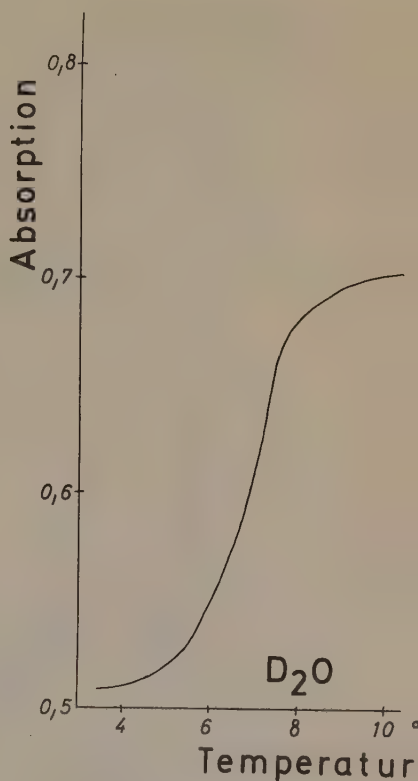


Abb. 8: UV-Schmelzkurven des Poly (U)

—— Mg^{2+} ---- K^+

Die Kurven des Mg^{2+} -Poly (U) sind typisch für sehr kooperativ verlaufende Sekundärstrukturänderungen. Die Schmelzpunkte sind:

in H_2O : $4,6^\circ\text{C}$

in D_2O : $7,1^\circ\text{C}$.

Die Schmelzkurve des K^+ -Poly (U) läßt vermuten, daß unterhalb von 0°C ebenfalls eine Strukturänderung eintritt. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Zmudzka und Shugar (42) am Na^+ -Salz des Poly (U).

3.2.2 Der Bereich der Basenschwingungen $1800 - 1550 \text{ cm}^{-1}$

Abb. 9 zeigt den Bereich der Ringvalenzschwingungen des Mg^{2+} - und des K^+ -Poly (U) bei 20° und bei 2°C .

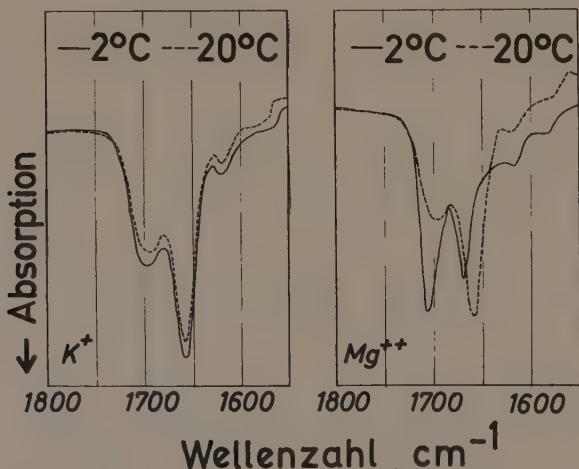


Abb. 9: IR-Spektren von Mg^{2+} - und K^+ -Poly (U).

Nach Miles (43) können die Banden in den Spektren bei 20°C wie folgt zugeordnet werden:

1658 cm^{-1} : Valenzschwingung der $\text{C}(4)=\text{O}$ -Gruppe.

1697 cm^{-1} : Valenzschwingung der $\text{C}(2)=\text{O}$ -Gruppe.

Beim Abkühlen des K^+ -Salzes treten im Bereich $1800 - 1550 \text{ cm}^{-1}$ keinerlei Veränderungen im Spektrum auf. Beim Abkühlen des Mg^{2+} -Salzes zeigt sich jedoch die in 3.1 diskutierte Sekundärstrukturbildung durch eine Verschiebung beider Banden zu größeren Wellenzahlen. Die Bande bei 1658 cm^{-1} verschiebt sich nach 1670 cm^{-1} , die bei 1697 cm^{-1} nach 1707 cm^{-1} . Beide verschieben sich also um etwa denselben Betrag nach höheren Wellenzahlen, der Abstand zwischen beiden Banden ändert sich praktisch nicht. Die Intensität der Banden bei 1658 cm^{-1} nimmt dabei etwas ab, während sich die der Bande bei 1697 cm^{-1} beträchtlich vergrößert.

3.2.3 Mögliche doppelhelikale Basenpaarungen des Mg^{2+} -Poly (U)

Abb. 10 zeigt die möglichen doppelhelikalen Strukturen der Basenreste.

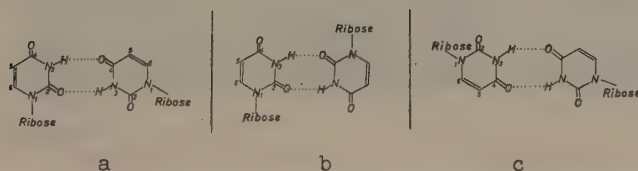


Abb. 10: Mögliche doppelhelikalen Strukturen des Poly (U).

Im Falle der Basenpaarung a sollten sich beide Banden in entgegengesetzter Richtung verschieben, sowie es Howard et al. (44) beim (G+C)-Paar fanden. Man beobachtet aber keine Vergrößerung des Abstandes der beiden Banden, sondern nur eine Verschiebung zu größeren Wellenzahlen. Somit kann man die Basenpaarung a ausschließen. Die Möglichkeiten b und c müßten eine Aufspaltung oder

zumindest eine Verbreiterung der Valenzbande der $C(4)=O$ - oder der $C(2)=O$ -Gruppe hervorrufen, da die Übergangsmomente der Carbonylgruppen in dieser Konfiguration antiparallel sind und daher koppeln müßten. Somit kann keine doppelhelikale Struktur vorliegen.

3.2.4 Mögliche tripelhelikale Basenpaarungen des Mg^{2+} -Poly (U)

Abb. 11 zeigt die Möglichkeiten der Basenpaarung im Falle der Bildung einer Tripelhelix. Man sieht, daß die Carbonylgruppen und damit auch die Übergangsmomente ihrer Valenzschwingungen in keinem der beiden Fälle parallel oder antiparallel sind. Somit sind keine Bandenaufspaltungen oder Bandenverschiebungen durch Kopplung zu erwarten. Im Hinblick auf die IR-Meßergebnisse ist es daher wahrscheinlich, daß sich keine Doppel-, sondern eine Tripelhelix bildet.

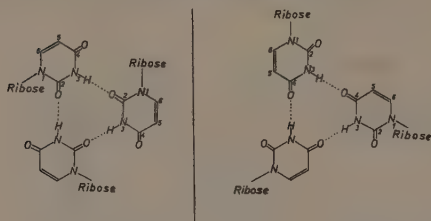


Abb. 11: Mögliche tripelhelikale Basenpaarungen des Poly (U).

Ungewöhnlich ist, daß sich beide $C=O$ -Valenzbanden zu höheren Wellenzahlen verschieben. Bei Ausbildung einer Wasserstoff-Brücken-Bindung verschiebt sich die Valenzbande der Akzeptorgruppe zu tieferen Wellenzahlen. Beide Carbonylgruppen bilden also in der Sekundärstruktur schwächere oder weniger Wasserstoff-Brücken aus als im ungeordneten Zustand. Im Falle der Tripelhelix ist dies verständlich. Im ungeordneten Zustand bilden beide Sauerstoffatome jedes Basenrests zwei Wasserstoff-Brücken-Bindungen mit OD -Gruppen von D_2O -Molekülen, denn beide freien Elektronenpaare können OD -Gruppen als Akzeptorgruppen dienen. Dies verringert die Stärke der $C=O$ -Bindung und verschiebt die Bande der Valenzschwingung zu tieferen Wellenzahlen. In der Tripelhelix dagegen bildet eine $C=O$ -Gruppe nur eine Wasserstoff-Brücke zur $N-D$ -Gruppe, während die andere wie vorher auch mit D_2O -Molekülen wechsel-

wirken könnte. Wie der Bau von CPK-Molekülmodellen (Abb. 12) jedoch zeigt, ist der Zutritt von D_2O -Molekülen zu diesen freien Carbonyl-Gruppen sterisch gehindert, so daß sich höchstens eine Wasserstoff-Brücke ausbilden kann. Somit bilden beide Carbonylsauerstoff-Atome weniger Wasserstoff-Brücken-Bindungen aus als im ungeordneten Zustand. Dadurch bleibt die $C=O$ -Bindung stärker und die Bande der Valenzschwingung ist weniger stark nach kleinen Wellenzahlen verschoben.

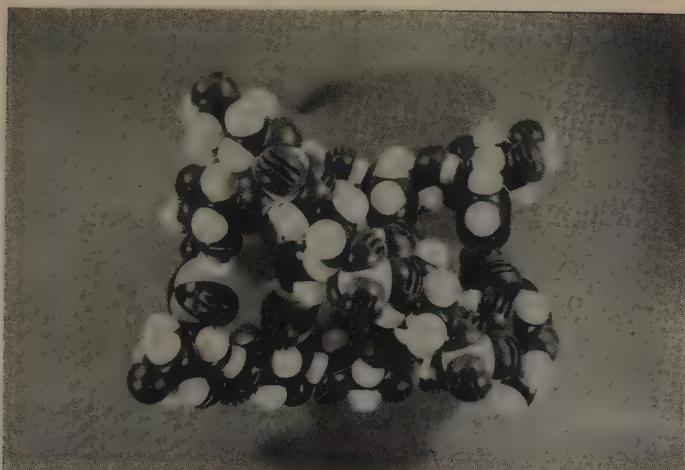
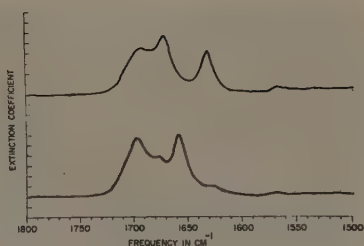
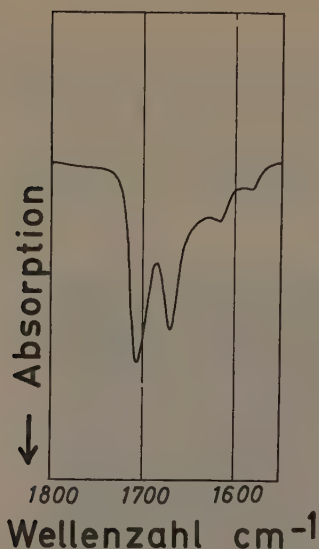


Abb. 12: Modell einer Mg^{2+} -Poly (U)-Tripelhelix.

Der Vergleich mit einer IR-Untersuchung von Miles (43) an dem System Poly (A) + Poly (U) in D_2O -Lösung macht ebenfalls die Ausbildung einer Tripelhelix beim Mg^{2+} -Poly (U) wahrscheinlich. Denn die Spektren der Poly (A+2U)-Tripelhelix im Bereich der Carbonylschwingungen des Uracils ähneln sehr den Spektren des Mg^{2+} -Poly (U) bei tieferen Temperaturen. Vor allem ist zu beobachten, daß sich ebenfalls das Intensitätsverhältnis der beiden Banden umkehrt (Abb. 13).



a

b

Abb. 13: a) IR-Spektrum des Mg^{2+} -Poly (U), 2°C in D_2O
 b) IR-Spektren der Poly (A+U)-Doppelhelix (oben)
 und Poly (A+2U)-Tripelhelix (unten) nach
 Miles (43).

In Tabelle 1 sind die Bandenlagen der Poly (A+U)-Doppelhelix, der Poly (A+2U)-Tripelhelix und der Strukturen des Mg^{2+} -Poly (U) und des K^+ -Poly (U) bei tiefen Temperaturen gegenüber gestellt.

	$\text{C}(4)=\text{O} \text{ (cm}^{-1}\text{)}$	$\text{C}(2)=\text{O} \text{ (cm}^{-1}\text{)}$
Poly (A+U)	1672 stark	1691 mittel
Poly (A+2U)	1677 mittel	1696 stark
Mg^{2+} -Poly (U)	1670 mittel	1707 stark
K^+ -Poly (U)	1658 stark	1697 mittel
		(nach Miles (43): 1691 mittel)

Miles (43) nahm die Spektren von Poly (A+U) und Poly (A+2U) im Bereich der Valenzschwingungen der Basenreste auf. Abb. 14 zeigt die Watson-Crick-Paarung des (A+U)-Paares, Abb. 15 die von Miles (43) postulierten Basenpaarungen in der (A+2U)-Tripelhelix.

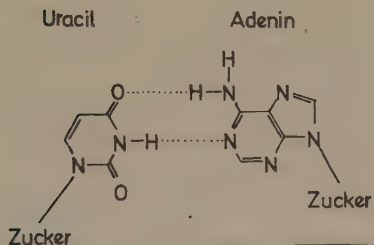


Abb. 14: Watson-Crick-Paarung von (A+U).

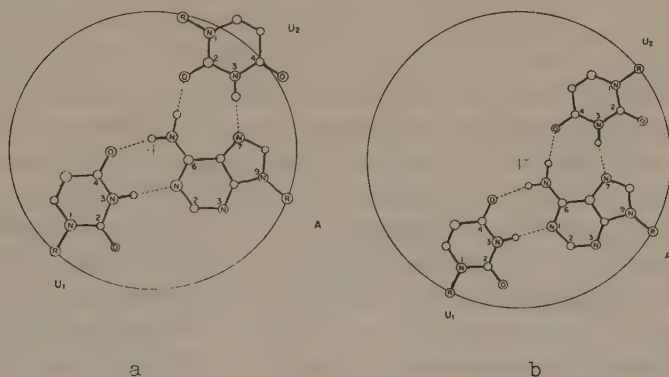


Abb. 15: Mögliche Basenpaarungen der (A+2U)-Tripelhelix nach Miles (43)

Das Spektrum der (A+U)-Doppelhelix zeigt gegenüber dem Spektrum des ungeordneten Poly (U) nur den Unterschied, daß die Bande der C(4)=O-Valenzschwingung zu höheren Wellenzahlen verschoben ist. Aus Abb. 14 kann man entnehmen, daß die C(4)=O-Gruppe eine Wasserstoff-Brücke zur N(3)-H-Gruppe des Adenins eingeht. Damit

kann sie, wie schon zuvor diskutiert, nur eine Wasserstoff-Brücke ausbilden und rückt nach höheren Wellenzahlen, während die C(2)=O-Gruppe in ungestörtem Kontakt mit dem Lösungsmittel ist und daher ihre Valenzschwingung die Lage nicht verändert. Erst bei Ausbildung der Tripelhelix verschiebt sich auch die Valenzschwingung der C(2)=O-Gruppe zu höheren Wellenzahlen und außerdem kehrt sich das Intensitätsverhältnis der beiden Banden um. Die geringe Verschiebung von 5 cm^{-1} (beim Poly (U): 10 cm^{-1}) deutet darauf hin, daß das Lösungsmittel in der Poly (A+2U)-Tripelhelix besseren Zugang zu den nicht in der Helix gebundenen C(2)=O-Gruppen hat als bei der Mg^{2+} -Tripelhelix. Umgekehrt ist die Verschiebung der Valenzschwingung der C(4)=O-Gruppe beim Mg^{2+} -Poly (U) mit 12 cm^{-1} weit geringer als bei der Poly (A+2U)-Tripelhelix (20 cm^{-1}), d. h. die Wasserstoff-Brücken-Bindungen bei der Helixbildung sind im Mg^{2+} -Poly (U) kräftiger. Die Ursache dafür liegt vermutlich in dem durch den induktiven und mesomeren Effekt der beiden benachbarten Sauerstoffatome niedrigen pKa der Protonendonorggruppe N(7)-H im Uracil verglichen mit dem pKa der Protonendonorggruppe C(6)-NH₂ im Adenin. Für das Uracil gibt Aylward (75) den Wert 10 an, für das Adenin findet man 17. Somit ist die Wasserstoff-Brücke, die vom N(7)-H des Uracils ausgeht, kräftiger und damit die Bande der Valenzschwingung der C(4)=O-Gruppe mehr nach tiefen Wellenzahlen verschoben.

Es sei noch erwähnt, daß Miles (43) aufgrund seiner Ergebnisse eine Poly (A+2U)-Tripelhelix mit der Basenpaarung der Abb. 15a postulierte. In diesem Fall wären sowohl die C(4)=O- als auch die C(2)=O-Sauerstoffatome der Uracilmoleküle an den Wasserstoff-Brücken-Bindungen mit dem Adenin beteiligt. Eine Röntgenstrukturanalyse von Arnold und Bond (45) am Poly (A+2U) zeigt jedoch eindeutig, daß Struktur 15b mit den beiden C(4)=O-Gruppen als Akzeptoren verwirklicht ist. Dieses Ergeb-

nis entspricht vollkommen unserer Interpretation der Befunde.

Somit kann man auch eine eindeutige Entscheidung für eine der beiden tripelhelikalen Basenpaarungen des Mg^{2+} -Poly (U) der Abb. 11 fällen. Die Ergebnisse von Miles (43) und unsere IR-Messungen sprechen eindeutig für die Basenpaarung 11b mit den $C(4)=O$ -Sauerstoffatomen als Akzeptoren. Da sich nach Thriem et al. (38) bei der Sekundärstrukturbildung das Molekulargewicht nicht ändert, kann sich die Tripelhelix nur intramolekular bilden. Dies ist möglich, wenn sich die beiden Enden des Moleküls unter Ausbildung von zwei loops zurückfalten, wobei ein Rückgrat antiparallel zu den beiden anderen verläuft. Diese Struktur konnte mit CPK-Molekülmodellen verwirklicht werden (Abb. 12).

Daß eine Tripelhelix innerhalb eines Moleküls auch in der Natur realisiert sein kann, zeigt das Kollagen-Molekül. Von verschiedenen Autoren (46) - (48) wurden tripelhelikale Bereiche innerhalb einzelner Kollagen-Moleküle gefunden.

3.2.5 Der Bereich der Schwingungen des Zucker-Phosphat-Rückgrats

Abb. 16 zeigt den Bereich der Banden des Zucker-Phosphat-Rückgrats. Im Bereich $1100 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ beobachtet man beim Mg^{2+} -Poly (U) beim Übergang von H_2O zu D_2O als Lösungsmittel eine Verschiebung der antisymmetrischen $C-O-C$ -Valenzschwingung der Ribose, die in H_2O bei 1068 cm^{-1} liegt, zu höheren Wellenzahlen, wodurch sie mit der Bande der symmetrischen PO_2^- -Valenzschwingung bei 1086 cm^{-1} zusammenfällt. Gleichzeitig taucht bei 1035 cm^{-1} die Deformationsschwingung der $2'$ -OD-Gruppe der Ribose als breite Schulter auf. Wie in (49)

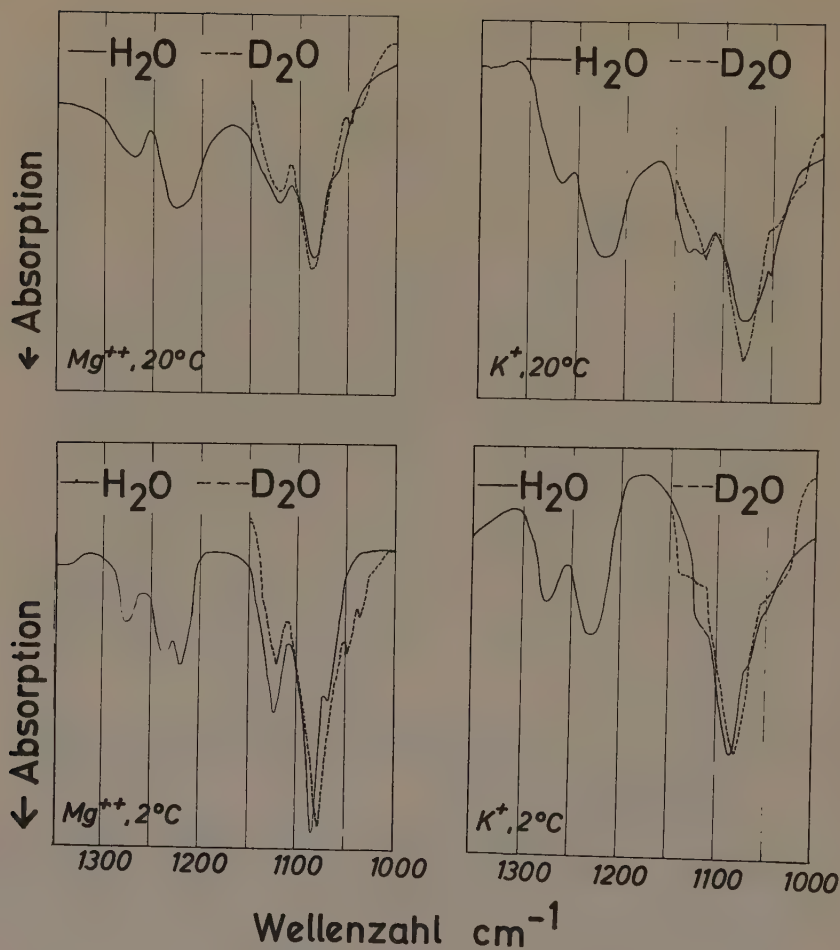


Abb. 16: IR-Spektren von Salzen des Poly (U)
 links: Mg^{2+} rechts: K^+
 oben: 20°C unten: 2°C

Das bedeutet, daß die gebildete Struktur zwar stabiler ist, ihre Kooperativität aber sehr viel kleiner. Die Stabilisierungskräfte der Sekundärstruktur des 2'-O-Methyl-Poly (U) müssen also von ganz anderer Art sein als die für das Poly (U) diskutierten. Rabczenko und Shugar (40) postulierten, daß die hydrophobe Wechselwirkung zwischen den Methylgruppen und den Basenresten entscheidend ist für die Stabilisierung der vom 2'-O-Methyl-Poly (U) gebildeten Sekundärstruktur.

Der hohe Ordnungsgrad des Mg^{2+} -Poly (U)-Rückgrats bei tiefen Temperaturen zeigt sich auch in der Aufspaltung der Bande bei 1230 cm^{-1} in H_2O . Diese Bande wird der antisymmetrischen Valenzschwingung der PO_2^- -Gruppen zugeordnet (50) (51). IR-Untersuchungen an Filmen von Mg^{2+} -Poly (U) bei tiefen Temperaturen zeigten, daß diese Aufspaltung beim Deuterieren verschwindet. Somit muß eine deuterierungsabhängige Schwingung mit der antisymmetrischen PO_2^- -Valenzschwingung koppeln. In diesem Bereich kann das nur die Deformationsschwingung der 2'-OH-Gruppe der Ribose sein. Aus Untersuchungen an sekundären Alkoholen (52) weiß man, daß im Bereich $1450 - 1000\text{ cm}^{-1}$ ein Bandenpaar liegt, an dem die 2'-OH-Deformationsschwingung beteiligt ist. Die deuterierungsabhängige Aufspaltung bei der Bande bei 1230 cm^{-1} zeigt also, daß an ihr die 2'-OH-Deformationsschwingung beteiligt ist. Wenn diese Aufspaltung auftritt, dann muß das Rückgrat in einer Konformation vorliegen, in der die Übergangsmomente der antisymmetrischen PO_2^- -Valenzschwingung und der 2'-OH-Deformationsschwingung parallel oder antiparallel angeordnet sind. Eine solche Konformation kann erreicht werden, wenn man im Rückgrat des Poly(U) die $-\text{CH}_2-$ und die PO_2^- -Gruppen gegeneinander um die Esterbindung verdreht. Dies kann man an CPK-Modellen zeigen (Abb.18).

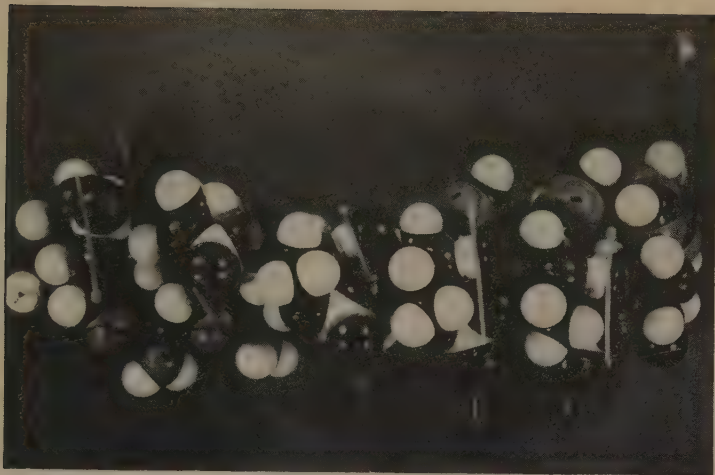


Abb. 18: CPK-Modell einer Monohelix, in der die Phosphatgruppen den Basen zugekehrt sind (49).

Die Basenreste werden dabei zu den Phosphatgruppen hingedreht (49). Diese Rückgratstruktur führt zu einer relativ steifen Monohelix mit Rechtsschraubensinn.

Abb. 16 kann man entnehmen, daß diese Struktur bei 20°C beim Mg^{2+} -Poly (U) nicht mehr ausgebildet ist, da die Aufspaltung der Bande bei 1230 cm^{-1} verschwunden ist. Das bedeutet, daß das Schmelzen der helikalen Struktur auch eine Zerstörung dieser Konformation des Rückgrats bewirkt.

3.3 Untersuchungen am Li^+ -Poly (U)

Es ist zu erwarten, daß auch das kleine, hochgeladene Li^+ -Ion besondere Konformationen beim Poly (U) induzieren kann. Es wird sich zeigen, daß im Li^+ -Poly (U) die in 3.2.5 diskutierte Wasserstoff-Brücke im Rückgrat besonders kräftig ausgebildet ist. Es stellt sich die Frage, ob evtl. auch eine Helix entsteht.

3.3.1 UV-Schmelzkurve

Wie das Absorptions-Temperaturdiagramm des Li^+ -Poly (U) bei $261 \text{ m}\mu$ zeigt (Abb. 19), tritt zwischen 3°C und 50°C keine wesentliche Änderung der Absorption ein. Dies bedeutet, daß keine Stapelung der Basen bei Verringerung der Temperatur stattfindet. Dieser Befund schließt bereits die Bildung einer Doppel- oder Tripelhelix aus.

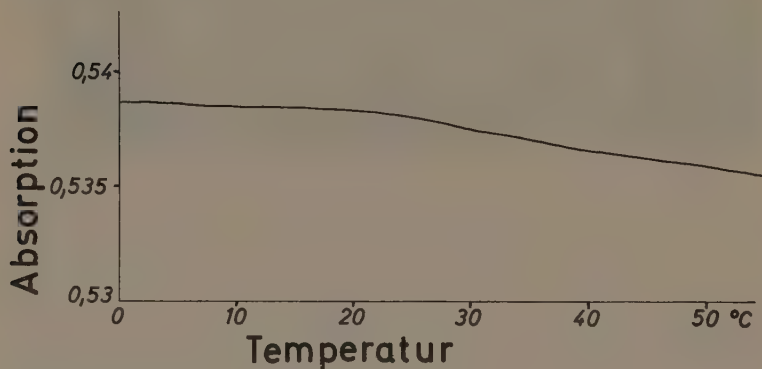


Abb. 19: UV-Schmelzkurve des Li^+ -Poly (U) bei $261 \text{ m}\mu$.

3.3.2 Der Bereich $1800 - 1550 \text{ cm}^{-1}$

Abb. 20 zeigt den Bereich der Valenzschwingungen des Uracils ($1800 - 1550 \text{ cm}^{-1}$) bei 3°C (Zuordnung der Banden siehe 3.2.2). Bei Temperaturerhöhung ändert sich das Spektrum nicht. Das bedeutet, daß zwischen den Basen keine Wasserstoff-Brücken-Bindungen auftreten, die zu Bandenverschiebungen führen würden. Damit kann man also die Bildung einer Doppel- oder Tripelhelix mit Sicherheit ausschließen.

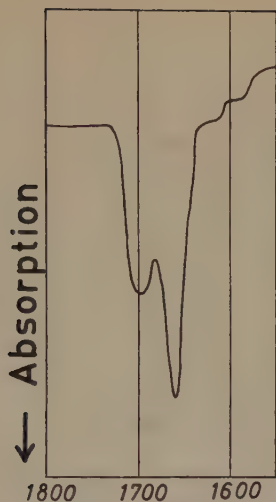


Abb. 20: IR-Spektrum des
Li⁺-Poly (U) bei 3^oC.

Wellenzahl cm⁻¹

3.3.3 Banden des Zucker-Phosphat-Rückgrats

Abb. 21 zeigt den Bereich der Valenzschwingungen des Zucker-Phosphat-Rückgrats bei 3^oC und bei 50^oC. Dabei wurde in D₂O ausnahmsweise bis 800 cm⁻¹ gemessen, um auch die Bande der antisymmetrischen O-P-O-Valenzschwingung zu erhalten, die von Shimanouchi et al. (20) beim Diäthylphosphat bei 814 cm⁻¹ beobachtet wurde.

Die beim Abkühlen beobachtete Bandenverschiebung der 2'-OD-Deformationsschwingung von 1050 cm⁻¹ nach 1037 cm⁻¹ und die Verschiebung der Bande der antisymmetrischen C-O-C-Valenzschwingung der Ribose nach größeren Wellenzahlen, so daß sie durch die Bande der symmetrischen PO₂⁻-Valenzschwingung verdeckt wird, zeigen, daß auch beim Li⁺-Poly (U) diese beiden Schwingungen miteinander koppeln. Der Grund ist die in 3.2.5 diskutierte räumliche Fixierung der beiden Gruppen durch die Wasserstoff-Brücken-Bindung von der 2'-OD-Gruppe zur Äthergruppe der Ribose. Die Li⁺-Ionen induzieren also diese Rückgratkonformation ohne jedoch die Bildung einer helikalen Sekundärstruktur zu ermöglichen.

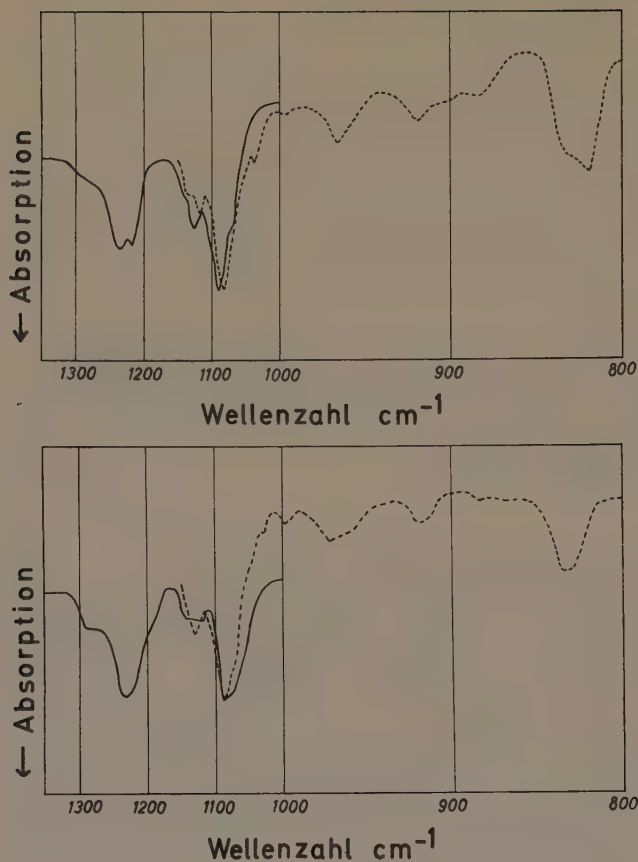


Abb. 21: IR-Spektren des Li⁺-Poly (U)

oben: 3°C unten: 50°C

—— H₂O ----- D₂O

Diese besondere Struktur des Rückgrats zeigt sich auch an der Bande bei 1230 cm⁻¹. Aus Abb. 21 kann man entnehmen, daß bei tiefer Temperatur an der langwelligen Flanke der antisymmetrischen PO₂⁻-Valenzschwingung (1235 cm⁻¹)

eine zweite Bande bei 1218 cm^{-1} entstanden ist. Die Vermutung liegt nahe, daß dies eine Aufspaltung der Phosphatbande ist, wie sie in 3.2.5 diskutiert wird. Dem widerspricht jedoch die Tatsache, daß dieser Effekt auch in D_2O auftritt. Aber auch mit den hier vorliegenden Ergebnissen kann man diese Interpretation ausschließen. Tab.2 kann man entnehmen, daß beim Li^+ -Poly (U) beide Banden gegenüber dem Mg^{2+} -Poly (U) zu kleineren Wellenzahlen verschoben sind.

Poly (U), 0,01 n Mg^{2+} -Kakodylat	1237	1222,5
Poly (U), 0,01 n Li^+ -Kakodylat	1235	1218

Tabelle 2: Bandenlagen im Bereich $1250 - 1200\text{ cm}^{-1}$ in H_2O , 3°C , pH 6,8 (in cm^{-1})

Dies kann nicht das Ergebnis einer stärkeren oder schwächeren Kopplung zwischen der antisymmetrischen PO_2^- -Valenzschwingung und der Schwingung mit 2'-OH-Deformations-schwingungsanteil sein. In diesem Fall wäre die Aufspaltung größer oder kleiner, d.h. die beiden Komponenten wären symmetrisch weiter auseinander- oder näher zusammengedrückt. Diese Tatsache und auch das Aussehen des Bandenkomplexes legen die Vermutung nahe, daß hier keine durch die diskutierte Kopplung hervorgerufene Aufspaltung vorliegt. Dies wird bestätigt durch die Tatsache, daß beim Abkühlen auch an der Bande der antisymmetrischen O-P-O-Valenzschwingung bei 832 cm^{-1} Veränderungen auftreten. An der langwelligen Flanke dieser Bande entsteht eine neue intensive Bande bei 820 cm^{-1} .

Es scheint, als würden die Li^+ -Ionen in eine sehr spezifische Wechselwirkung mit den Phosphatgruppen treten. Um zu überprüfen, ob dies speziell auf das Poly (U) zutrifft oder allgemein gültig ist für die Wechselwirkung zwischen Li^+ -Ionen und Phosphodiestergruppen, wurden IR-Spektren von K^+ - und Li^+ -Dibutylphosphat aufgenommen. (Die Proben wurden

durch Neutralisation von H^+ -Dibutylphosphat mit konzentrierter KOH- bzw. LiOH-Lösung hergestellt). Abb. 22 zeigt, daß die beiden Spektren völlig identisch sind.

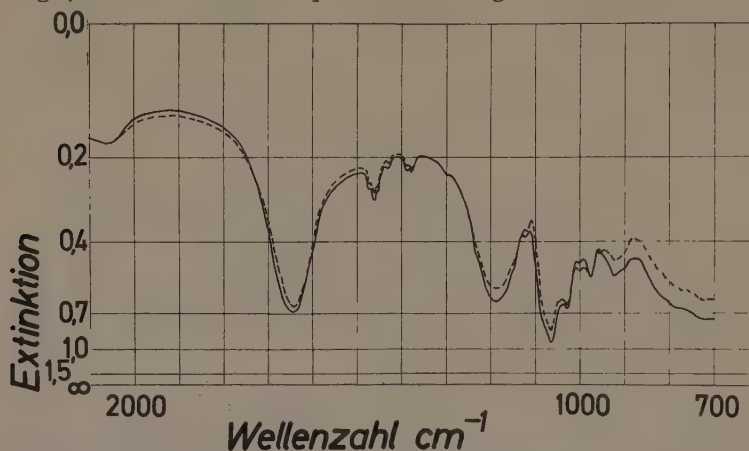


Abb. 22: IR-Spektren von Dibutylphosphat

————— Li^+ - - - - - K^+

Die Li^+ -Ionen haben also keinen speziellen Einfluß auf die Phosphodiestergruppen. Dies entspricht auch den Befunden von Kölkenbeck (23), der beim Poly (A) und beim Poly (C) keine spezifischen Veränderungen der Banden der Phosphatgruppen durch Li^+ -Ionen feststellte.

Das Li^+ -Poly (U) hat also eine ausgeprägte Rückgratstruktur durch Wasserstoff-Brücken zwischen den Ribosemolekülen (2'-OH zu O(4)). Diese Konformation hat Einfluß auf die Natur der Phosphatgruppen.

4.0 Untersuchungen an der tRNA^{Phe}

4.1 Derzeitiger Wissensstand

Die tRNAs sind Nukleinsäuren im Molekulargewichtsbereich 25000 - 30000; das entspricht einer Kettenlänge von 75 - 85 Nukleotiden. Auf das Problem der Isolierung einzelner Spezies aus dem Gemisch der tRNAs wurde in 2.1.1 kurz eingegangen.

Außer den in allen RNAs vorkommenden Nukleosiden A, U, G und C enthalten die tRNAs mehr als 30 verschiedene seltene Nukleoside. Die Struktur der meisten von ihnen konnte aufgeklärt werden, einige sind noch unbekannt. Die tRNA^{Phe} aus Hefe enthält zum Beispiel die unbekannte Nukleinbase Y im Anticodon-loop (Abb. 1). Nakanishi et al. (53) postulierten zwar eine Strukturformel für Y, die jedoch noch nicht endgültig gesichert ist (Abb. 23).

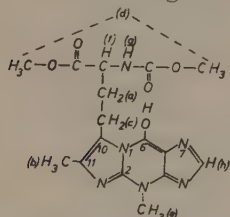


Abb. 23: Die Struktur der unbekannten Nukleinbase Y in tRNA^{Phe} nach Nakanishi et al. (53).

Der entscheidende Schritt in der tRNA-Forschung gelang Holley et al. (54) mit der Aufklärung der Primärstruktur einer tRNA^{Ala} aus Hefe und Zachau et al. (55) mit der von tRNA^{Ser}_{I+II} aus Hefe.

Bei der Sequenzanalyse wird die tRNA zuerst von Endonukleasen an speziellen Stellen des Moleküls gespalten. Die entstehenden Oligonukleotide werden dann von Exonukleasen vom 3'- bzw. 5'-Ende her abgebaut. Durch Kombination der Oligonukleotide, die sich bei Behandlung der tRNA mit verschiedenen Endonukleasen teilweise überlappen, kann man die Sequenz ermitteln. Mit dieser Methode bestimmten RajBhandary et al. (29) die Sequenz der in dieser Arbeit untersuchten tRNA^{Phe} aus Hefe (Abb. 1).

Holley et al. (54) hatten gleich nach Aufklärung der Primärstruktur von tRNA^{Ala} aus Hefe erkannt, daß bestimmte Bereiche des Moleküls unter Bildung von Watson-Crick-Basenpaaren miteinander verbunden werden können. Sie postulierten

drei mögliche Strukturen, eine langgestreckte, eine gewinkelte und eine kleeblattförmige. Alle drei haben dieselbe Anzahl an Basenpaaren. Das Kleeblattmodell wurde jedoch von Anfang an bevorzugt. Inzwischen gibt es eine Reihe von Beweisen für basengepaarte Regionen in der tRNA.

Die Verfolgung der Temperaturabhängigkeit der Hyperchromizität (56) zeigte, daß die Stapelung der Basen ähnlich ist wie bei bekannten doppelhelikalen Polynukleotiden. Von besonderem Interesse sind die IR- und Raman-spektroskopischen Untersuchungen von Thomas et al. (57) - (59). In (57) wird eine IR-Methode beschrieben, mit deren Hilfe man den Anteil von gepaarten Basen in einem Polynukleotid und zusätzlich den Prozentsatz an (G+C)- und (A+U)-Paaren errechnen kann. Eine Anwendung dieser Methode auf einige tRNAs ergibt 34 - 37 ungepaarte und 40 - 42 gepaarte Basen, Werte, die mit dem Kleeblattmodell sehr gut übereinstimmen.

Mit Sicherheit jedoch sind die tRNAs keine planaren Scheibchen, sondern unter Ausbildung einer Tertiärstruktur dreidimensional gefaltet. Auch dafür gibt es zahlreiche Beweise. Untersuchungen von Zachau et al. (60) - (63) vor allem an tRNA^{Phe} aus Hefe geben verschiedene Hinweise in dieser Richtung. So fanden sie, daß die tRNA bei Behandlung mit HCl die unbekannte Base Y im Anticodon-loop verliert, ohne daß dabei das Molekül aufgebrochen wird. Die so veränderte tRNA wird von Synthetasen aus E.coli nicht mehr beladen (heterologe Beladung), wohl aber von Synthetasen aus Hefe (homologe Beladung). Da man aber aus anderen Experimenten weiß, daß im Anticodon-loop nicht die Erkennungsregion für die Synthetasen liegt, muß eine Veränderung der Tertiärstruktur eingetreten sein.

Weiterhin fanden diese Autoren, daß die seltenen Basen 1-Methyladenin (1mA) und 7-Methylguanin (7mG), die im Pseudouracil-loop bzw. im Mini-loop liegen, von dem reduzierenden Agens NaBH₄ nicht angegriffen werden, d. h. daß die Tertiärstruktur diesem Agens den Zutritt zu diesen beiden Basen verwehrt. Zu diesem Befund paßt, daß Acrylnitril, das γ (Pseudouracil) modifiziert, das in allen tRNAs vorkommende γ nicht angreift (64), obwohl es nach dem Kleeblattmodell in einem einsträngigen Bereich liegen sollte. Der sogenannte Pseudouracil-loop muß also durch die Tertiärstruktur geschützt sein.

Native und denaturierte tRNA^{Phe} aus Hefe wird an verschiedenen Stellen des Moleküls von T1 RNase angegriffen, d. h. in der nativen Form sind durch die Tertiärstruktur gewisse Teile des Moleküls geschützt, die bei der Denaturierung freigelegt werden.

Römer et al. (18) und Riesner et al. (65) entwickelten eine Methode, mit der sie differenzierte UV-Schmelzkurven verschiedener tRNAs aufnehmen konnten. Als besonders interessant erwies sich dabei die tRNA^{Ala} aus Hefe, bei der man drei voneinander getrennte Schmelzintervalle beobachtet, die stark von der Konzentration an Mg^{2+} abhängen. Die Zuordnung dieser drei Bereiche zum molekularen Geschehen in der tRNA ist noch nicht eindeutig, es scheint aber so, als induzierten die Mg^{2+} -Ionen eine Tertiärstruktur, die speziell Übergang 1 stabilisiert und diesen Übergang mit Übergang 2 koppelt. In Übergang 2 schmelzen vermutlich zwei Zweige des Kleeblatts gekoppelt.

Wichtige Hinweise auf die Tertiärstruktur gaben auch Thomas et al. (66) und (59) mit ihren Raman-Untersuchungen. Anhand zweier Banden bei 814 cm^{-1} und 1100 cm^{-1} können sie Aussagen machen über den Ordnungsgrad des Rückgrats und über den Anteil an gestapelten Basen in einem Polynukleotid. Sie fanden heraus, daß auch in den nichtgepaarten Regionen der tRNAs etwa $2/3$ der Basen gestapelt sind, was den hohen Ordnungsgrad auch dieser Bereiche verdeutlicht.

Bei Anregung mit UV-Strahlung der Wellenlänge $335\text{ m}\mu$ bildet sich bei der tRNA^{Val} aus E.coli eine kovalente Bindung zwischen der Base Nr. 8 (4-TU) und der Base Nr. 13 (C) (67). In der Raumstruktur müssen also diese beiden Basen benachbart sein.

Beardsley und Cantor (68) bestimmten den Abstand zwischen der Y-Base und dem CCA-Ende (Akzeptorende) von tRNA^{Phe} durch Singulett-Singulett-Energieübertragung von der Y-Base zu einem Akzeptor, der an das CCA-Ende gebunden war, zu mindestens $40\text{ \AA}$.

Die erfolgversprechendste Methode zur Aufklärung der Tertiärstruktur ist auch bei tRNA die Röntgenstrukturanalyse. Die Schwierigkeiten bestehen darin, daß die Substanz kristallin vorliegen muß und es erhebt sich dann die Frage nach der biologischen Relevanz der Aussagen. Kürzlich gelang es, tRNA^{Phe} aus Hefe zu kristallisieren und eine Röntgenstrukturanalyse mit $4\text{ \AA}$ Auflösung zu machen (69) (70). Auf die Ergebnisse dieser Untersuchung gehe ich später ausführlich ein.

Aufgrund der hier erwähnten und vieler anderer Ergebnisse wurden oft Versuche unternommen, die Tertiärstruktur von tRNAs zu ermitteln. Auf einige wichtige von ihnen soll hier noch kurz eingegangen werden.

Abraham (71) postuliert sein Modell vor allem aufgrund theoretischer Überlegungen. Er geht von der Voraussetzung aus, daß in vivo bei der Transkription den tRNA-Molekülen an der mRNA nur ein sehr beschränkter Raum mit einer Breite von etwa 25 Å zur Verfügung steht. Somit müssen die tRNAs längliche Moleküle sein mit maximaler Stapelung der Basen. Um dies zu erreichen, postulierte er eine Wasserstoff-Brücke zwischen der 2'-OH-Gruppe der Ribosemoleküle zum Ringsauerstoff der benachbarten Ribose und erhält somit eine Struktur, die systematisch und räumlich in Abb. 24 dargestellt ist.

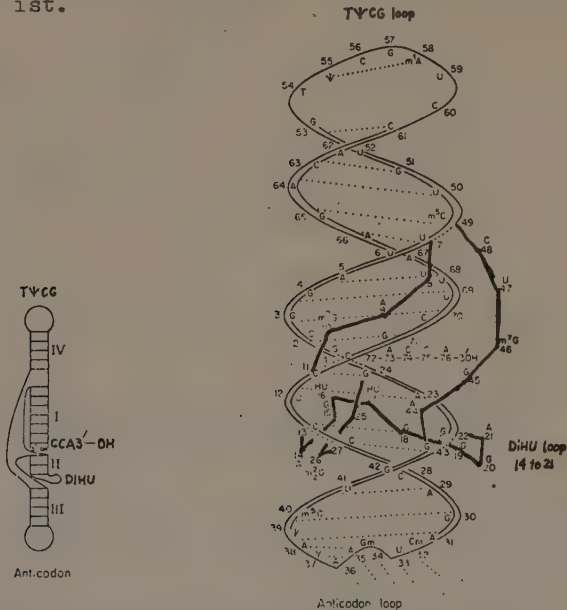


Abb. 24: Tertiärstruktur von tRNA nach Abraham (71)
links: schematisch rechts: räumlich

Zu dieser Vorstellung passen gut die Ergebnisse von Thomas et al. (59) (66), die einen sehr hohen Ordnungsgrad des Rückgrats (83 - 85%) und eine große Anzahl gestapelter Basen (2/3 der nichtgepaarten) fanden. In der postulierten Tertiärstruktur ist das Akzeptorende nicht entgegengesetzt zum Anticodon, die Dimensionen des Moleküls sind $85 \times 35 \times 28$ Å. Die loops sind an der Oberfläche und können so mit den Enzymen wechselwirken.

Ninio et al. (72) entwerfen ihr Modell (Abb. 25) aufgrund der Röntgenkleinwinkelstreuung von tRNA^{Val} aus E.coli und des Befundes, daß die Basen Nr. 8 und Nr. 13 benachbart sein müssen (67).

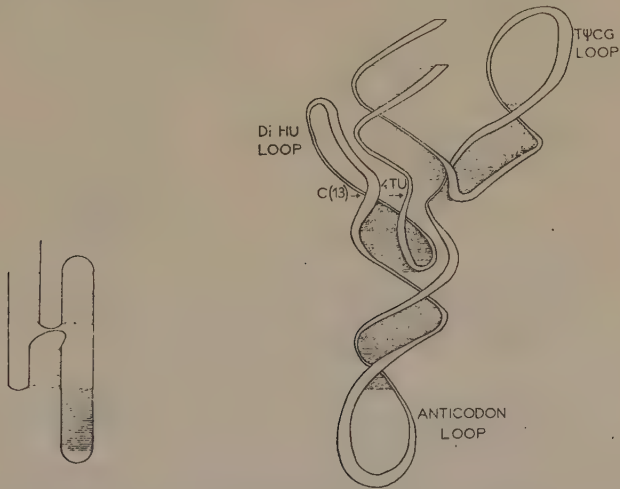


Abb. 25: Tertiärstruktur von tRNA^{Val}₁ aus E.coli nach Ninio et al. (72).
links: schematisch rechts: räumlich

Das wohl am besten gesicherte Modell wurde von Kim et al. (70) mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse entworfen, allerdings an kristallisiertem Material. Schematische und räumliche Darstellung zeigt Abb. 26. Noch einige Einzelheiten dieser Struktur: Der Abstand vom Anticodon loop zum Akzeptorende beträgt 82 Å, die Länge des Moleküls 77 Å und die Breite überraschenderweise nur 20 Å, was der Breite einer RNA-Doppelhelix entspricht. Der Abstand zwischen den Basen 8 und 13 beträgt 10 Å. Dieses Molekül entspricht also auch den Forderungen von Yaniv et al. (67) und von Abraham (71).

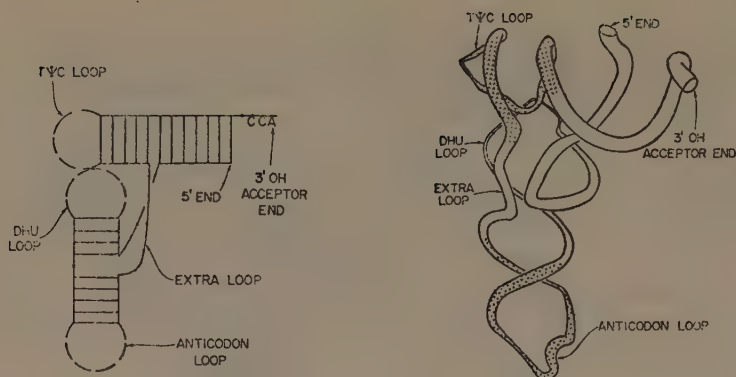


Abb. 26: Tertiärstruktur von tRNA^{Phe} aus Hefe nach Kim et. al. (70)
links: schematisch rechts: räumlich

Bei den bisherigen Betrachtungen wurden Bedeutung und Einfluß von Kationen auf die Tertiärstruktur außer acht gelassen. In der Einleitung wurde die überragende Bedeutung von Mg^{2+} -Ionen für den molekularen Ablauf der Translation erwähnt. Untersuchungen an tRNAs zeigten, daß auch bei ihrer Struktur und Funktion das Ionenmilieu einen entscheidenden Einfluß hat. Bereits erwähnt wurde, daß Mg^{2+} -Ionen die Kooperativität der Struktur von tRNA erhöhen (10) - (12). Auch auf die differenzierten Schmelzkurven von tRNA^{Ala} aus Hefe haben Mg^{2+} -Ionen einen großen Einfluß (18), wobei bereits bei 1 mM Mg^{2+} Sättigung erreicht wird. Alle drei Übergänge werden zu höheren Temperaturen verschoben, Übergang 1 nähert sich stark Übergang 2, während Übergang 3 sauber getrennt bleibt. Die noch nicht gesicherte Erklärung dafür ist, daß Mg^{2+} -Ionen eine Tertiärstruktur induzieren, die speziell Übergang 1 stabilisiert (Schmelzen des Akzeptor-zweiges?) und ihn mit Übergang 2 koppelt.

Die Raman-Spektren von tRNAs zeigen große Veränderungen, wenn zu den Lösungen Mg^{2+} -Ionen zugegeben werden (58) (59). Zum einen werden die Temperaturen, bei denen die Ordnung im Rückgrat und die Basenpaarung zerstört werden, beträchtlich höher (etwa 20°C) und zum andern ändern sich die Banden sowohl der Purin- als auch der Pyrimidinbasen. Thomas et al. schließen daraus, daß die Basen entweder direkt mit den Mg^{2+} -Ionen wechselwirken oder eine andere Konformation innerhalb der tRNA bekommen.

Auch CD-Spektren von tRNAs zeigen Veränderungen bei Zugabe von Mg^{2+} -Ionen. Willick und Kay (73) interpretieren ihre Ergebnisse dahingehend, daß 3 Mg^{2+} -Ionen pro tRNA mit einer Konstante $K = 3,2 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1}$ gebunden werden, die für eine Änderung der Tertiärstruktur verantwortlich sind. Diese Tertiärstruktur äußert sich vor allem in einer verstärkten oder vermehrten Stapelung der Basen.

Biologisch nicht unbedingt relevant, aber sehr interessant sind die ESR-Untersuchungen von Danchin und Gueron (74) an Mn^{2+} -Ionen, die an tRNAs gebunden sind. Ihre Ergebnisse zeigen, daß die ersten 4 Mn^{2+} -Ionen kooperativ bei einer freien Mn^{2+} -Konzentration von $3 \mu\text{M}$ gebunden werden. Insgesamt gibt es 4 - 6 starke Bindungsstellen für Mn^{2+} -Ionen ($K = 1,8 \cdot 10^5 \text{ Mol}^{-1}$) und 21 - 25 schwache Bindungsstellen ($K = 5 \cdot 10^3 \text{ Mol}^{-1}$). Der Abstand zwischen den starken Bindungsstellen ist so, daß sie über das ganze tRNA-Molekül verstreut sein müssen.

4.2. UV-Schmelzkurven

Die Abhängigkeit der Hyperchromizität von der Temperatur bei tRNAs wurde bereits ausführlich untersucht (18) (56) (65). Dabei hatte es sich gezeigt, daß Schmelztemperaturen und Form der Schmelzkurven sehr spezifisch vom Ionenmilieu

(Konzentration und Art der anwesenden Kationen) und auch von der Konzentration an tRNA abhängen. Da nun der Schmelzpunkt der tRNA-Proben für die IR-Messungen genau bekannt sein mußte, wurde er zuvor aus den UV-Schmelzkurven bestimmt. Abb. 27 zeigt zwei dieser Schmelzkurven unter Standardbedingungen.

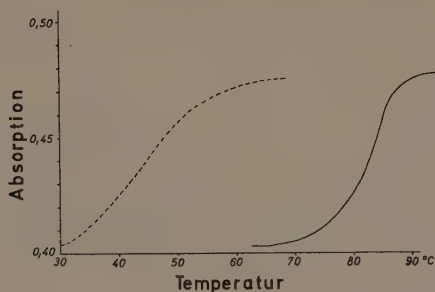


Abb. 27: UV-Schmelzkurven von tRNA^{Phe} (pH 6,8, 260 m_u)
 ————— 0,01 n Mg²⁺-Kakodylat
 - - - - - 0,01 n K⁺-Kakodylat

Deutlich ist zu sehen, daß die Mg²⁺-Ionen das Schmelzverhalten der tRNA^{Phe} auf zweierlei Weise beeinflussen:

1. Sie erhöhen die Schmelztemperatur von etwa 43°C beim K⁺-Salz auf etwa 83°C.
2. Sie verkleinern das Schmelzintervall von etwa 25°C (30°- 55°C) beim K⁺-Salz auf etwa 10°C (77°- 87°C).

Das erstere bedeutet, daß die Mg²⁺-Ionen die Struktur von tRNA^{Phe} stabilisieren und das zweite, daß sie zusätzlich kooperativer geworden ist. Es ist denkbar, daß diese sehr drastischen Veränderungen der Struktur sich auch in den IR-Spektren äußern.

4.3 Temperaturabhängige Veränderungen im IR-Spektrum

Die Untersuchungen des Schmelzverhaltens der Salze der tRNA^{Phe} im IR unterlag von Anfang an einer Einschränkung. Probemessungen am Mg²⁺-Salz zeigten schon früh, daß die tRNA die hohe Temperatur von 90°C über die gesamte Meßzeit von etwa 2 1/2 - 3 Stunden nicht ohne Hydrolyse übersteht. Dieser Schluß wurde aus völlig unerklärlichen Veränderungen in den Spektren gezogen. Als gut geeignet für unsere Zwecke erwies sich hingegen das K⁺-Salz, auf das sich daher die Diskussion beschränken wird.

Drastische Veränderungen bei Erhöhung der Temperatur sind im Bereich der Valenzschwingungen der Basen zu erwarten, was durch Abb. 28 bestätigt wird. Zur Interpretation dieser Spektren muß man nun Folgendes berücksichtigen: Die tRNA^{Phe} aus Hefe (Abb. 1) enthält 12 (G+C)-Paare, 8 (A+U)-Paare, 1 (G+U)-Paar, 1 (A+ γ)-Paar, 6 ungepaarte G, 5 ungepaarte C, 9 ungepaarte A, 4 ungepaarte U und 9 seltene Basen.

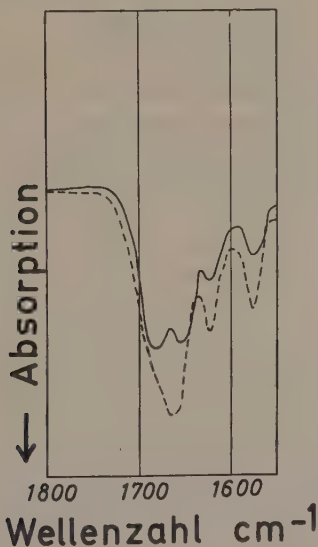


Abb. 28: IR-Spektren von tRNA^{Phe},
0,01 n K⁺-Kakodylat, pH 6,8, D₂O.
— 20°C
- - - 55°C

Die Valenzschwingungen aller dieser gepaarten und ungepaarten Basenreste müssen also in dem Bandenkomplex der Abb. 28 enthalten sein. Um die Zuordnung zu erleichtern sind in Tabelle 3 die Bandenlagen der Ribo-Homopolynukleotide und der Doppelhelices Poly (A+U) und Poly (G+C) gegenübergestellt. Dazu kommen noch die Bandenlagen, die Howard et al. (44) an dem System Poly (C) + 5'-GMP gemessen haben.

Poly (A)	1625 cm ⁻¹	Ringschwingung
	1575 cm ⁻¹	Ringschwingung
Poly (U)	1697 cm ⁻¹	C(2)=O-Valenzschwingung
	1658 cm ⁻¹	C(4)=O-Valenzschwingung
Poly (C)	1655 cm ⁻¹	C=O-Valenzschwingung
	1578 cm ⁻¹	Ringschwingung
Poly (G)	1680 cm ⁻¹	C=O-Valenzschwingung
	1585 cm ⁻¹	Ringschwingung
Poly (A+U) (43)	1691 cm ⁻¹	C(2)=O-Valenzschwingung des Poly (U)
	1672 cm ⁻¹	C(4)=O-Valenzschwingung des Poly (U)
	1630 cm ⁻¹	Ringschwingung des Poly (A)
Poly (G+C) (44)	1688 cm ⁻¹	C=O-Valenzschwingung des Poly (G)
	1647 cm ⁻¹	C=O-Valenzschwingung des Poly (C)
Poly (C)+5'-GMP bei 10°C	1683 cm ⁻¹	C=O-Valenzschwingung von GMP
	1645 cm ⁻¹	C=O-Valenzschwingung des Poly (C)
Poly (C)+5'-GMP bei 48°C	1660 cm ⁻¹	
tRNA ^{Phe} , 0,01 n K ⁺ bei 20°C	1680 cm ⁻¹	
	1653 cm ⁻¹	
	1625 cm ⁻¹	
	1579 cm ⁻¹	
tRNA ^{Phe} , 0,01 n K ⁺ bei 55°C	1665 cm ⁻¹	
	(Schulter bei 1690 cm ⁻¹)	
	1628 cm ⁻¹	
	1577 cm ⁻¹	

Tabelle 3 (Alle Bandenlagen in D₂O)

Bei 20°C, wenn alle Basenpaarungen ausgebildet sind, sind also folgende Schwingungen in den Banden der tRNA^{Phe} enthalten:

- 1680 cm⁻¹ : 1. Valenzschwingung der C(2)=O-Gruppe und der C(4)=O-Gruppe des U im (A+U)-Basenpaar (1691 cm⁻¹ und 1672 cm⁻¹)
 2. Valenzschwingung der C=O-Gruppe des G im (G+C)-Basenpaar (1688 cm⁻¹)
 3. Valenzschwingung der C=O-Gruppe des ungepaarten G (1680 cm⁻¹)
- 1653 cm⁻¹ : 1. Valenzschwingung der C=O-Gruppe des C im (G+C)-Paar (1647 cm⁻¹)
 2. Valenzschwingung der C=O-Gruppe des ungepaarten C (1655 cm⁻¹)
 3. Valenzschwingung der C(4)=O-Gruppe des ungepaarten U (1658 cm⁻¹)
- 1625 cm⁻¹ : Ringschwingung des gepaarten und ungepaarten A (1630 cm⁻¹ und 1625 cm⁻¹)
- 1579 cm⁻¹ : 1. Ringschwingung von C (1578 cm⁻¹)
 2. Ringschwingung von G (1585 cm⁻¹)

Nicht zu sehen ist die Valenzbande der C(2)=O-Gruppe des nicht gepaarten U, was bei einer Zahl von nur 4 ungepaarten Uracilresten in der tRNA^{Phe} nicht überraschend ist.

Bei Zerstörung der Struktur der tRNA^{Phe} durch Temperaturerhöhung tritt im Bereich der C=O-Valenzschwingungen nur noch eine einzige, breite Bande mit einem Maximum bei 1665 cm⁻¹ auf, die eine Schulter bei 1690 cm⁻¹ aufweist.

Dieses Schmelzverhalten ähnelt sehr dem, das Howard et al. (44) bei ihren Untersuchungen am Poly (C)+5'-GMP beobachteten (Tab. 3). Sie erhielten bei tiefer Temperatur (10°C) zwei Banden bei 1683 cm⁻¹ und 1645 cm⁻¹ und bei hoher Temperatur nur noch eine breite Bande bei 1660 cm⁻¹.

Man beobachtet also offensichtlich bei der tRNA^{Phe} vor allem das Schmelzen der 12 (G+C)-Paare. Beim Schmelzen der 8 (A+U)-Paare würde man die beiden Banden der C=O-Valenzschwingungen des Uracils bei 1697 cm^{-1} und 1658 cm^{-1} beobachten. Die Bande bei 1697 cm^{-1} sieht man als Schulter bei 1690 cm^{-1} , die bei 1658 cm^{-1} ist unter der breiten C=O-Valenzbande bei 1665 cm^{-1} verborgen.

Die beiden anderen Banden der tRNA^{Phe} bei 1625 cm^{-1} und 1579 cm^{-1} ändern ihre Lage nur unwesentlich (1628 cm^{-1} und 1577 cm^{-1}). Ihre Zuordnung zu Ringvalenzschwingungen macht dieses Verhalten verständlich.

Wie Römer et al. (18) gezeigt haben, geht den eben diskutierten temperaturabhängigen Veränderungen vermutlich die Zerstörung der Tertiärstruktur der tRNA voraus. In dieser Tertiärstruktur nun liegt das Zucker-Phosphat-Rückgrat mit Sicherheit in einer sehr spezifischen Konformation vor. Es sei noch einmal hingewiesen auf die Arbeiten von Abraham (71), der eine Wasserstoff-Brücken-Bindung zwischen der 2'-OH-Gruppe der Ribose und dem Äthersauerstoff der benachbarten Ribose forderte, und von Thomas et al. (59) (66), die feststellten, daß auch in den nicht basengepaarten Regionen der tRNAs 2/3 der Basen gestapelt sind. Es ist daher zu erwarten, daß beim Schmelzen auch im Bereich der Banden des Rückgrats Veränderungen auftreten. Zunächst soll jedoch diskutiert werden, welche Strukturmerkmale des Rückgrats man den IR-Spektren entnehmen kann.

Abb. 29 zeigt, daß beim Übergang von H₂O zu D₂O als Lösungsmittel die Bande der antisymmetrischen C-O-C-Valenzschwingung der Ribose bei 1065 cm^{-1} verschwindet, während die Bande der 2'-OD-Deformationsschwingung bei 1025 cm^{-1} auftaucht. Der Grund ist die in 3.2.5 diskutierte Wasserstoff-Brücken-Bindung zwischen den Ribosemolekülen von der 2'-OH-Gruppe zum Äthersauerstoff. Durch diese Brücke werden die

beiden beteiligten Gruppen in einer Konformation gehalten, in der ihre oben erwähnten Schwingungen miteinander koppeln können und ihre Banden sich deshalb in entgegengesetzter Richtung verschieben. Die Bande der antisymmetrischen C-O-C-Valenzschwingung der Ribose wird dabei in die Bande der symmetrischen PO_2^- -Valenzschwingung hineingeschoben.

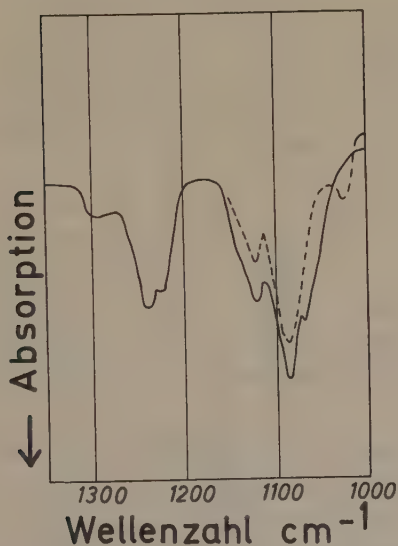


Abb. 29: IR-Spektren von tRNA^{Phe} ,
 0,01 n K^+ , pH 6,8, 20°C
 — H_2O - - - D_2O

Abb. 29 zeigt außerdem, daß die Bande der antisymmetrischen PO_2^- -Valenzschwingung in zwei Komponenten bei 1238 cm^{-1} und 1228 cm^{-1} aufgespalten ist. Dies ist vermutlich auf die bereits in 3.2.5 diskutierte Kopplung dieser Schwingung mit einer Schwingung mit 2'-OH-Deformationsanteil zurückzuführen. Die dazu erforderliche Struktur des Rückgrats (Drehung um eine Phosphoesterbindung) ist in Abb. 18 dargestellt.

Das Zucker-Phosphat-Rückgrat der tRNA^{Phe} bei ausgebildeter Tertiärstruktur hat also folgende Strukturmerkmale:

1. Eine Wasserstoff-Brückenbindung zwischen den Ribose-molekülen.
2. Wahrscheinlich zu den Basenresten hingedrehte Phosphatgruppen.

Diese speziellen Konformationen des Rückgrats sollten nun parallel zur Tertiär- und Sekundärstruktur bei Temperaturerhöhung zerstört werden. Daß dies eintritt, zeigt Abb. 30. Vergleichend neben die Temperaturspektren ist das Spektrum einer 2x12 Stunden gegen reines Wasser dialysierten Probe gestellt, bei der ebenfalls ein Zusammenbrechen der Rückgratstruktur zu erwarten ist (vgl. Kap. 4.4).

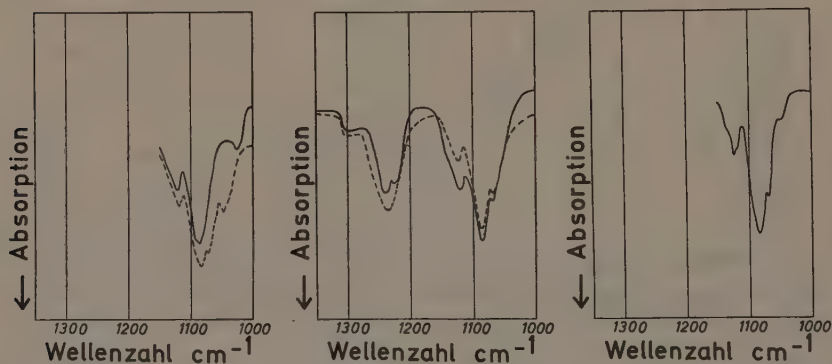


Abb.30: IR-Spektren von tRNA^{Phe}, 0,01 n K⁺, pH 6,8

links: D₂O

mitte: H₂O

——— 20°C

----- 55°C

rechts: 2x12 Stunden gegen H₂O dialysiert, 20°C, D₂O

In D_2O sind an der langwelligen Flanke der symmetrischen PO_2^- -Valenzbanden nun 2 Banden: Die der antisymmetrischen C-O-C-Valenzschwingung der Ribose bei 1072 cm^{-1} und die der 2'-OD-Deformationsschwingung bei 1046 cm^{-1} . Da nach Zerstörung der Wasserstoff-Brücken-Bindung zwischen den Ribosemolekülen die Kopplung zwischen diesen beiden Schwingungen aufgehoben ist, haben sich ihre Banden verschoben: Die der C-O-C-Valenzschwingung zu kleineren Wellenzahlen aus der Phosphatbande heraus und die der 2'-OD-Deformationsschwingung zu größeren Wellenzahlen (1025 cm^{-1} nach 1046 cm^{-1}).

In H_2O sieht man, daß bei Temperaturerhöhung die Aufspaltung der Bande der antisymmetrischen PO_2^- -Valenzschwingung verschwunden ist und daß die Bande genau in der Mitte zwischen den beiden Komponenten bei 1233 cm^{-1} liegt. Dies bedeutet, daß die vermutete Kopplung zwischen der antisymmetrischen PO_2^- -Valenzschwingung und der Schwingung mit 2'-OH-Deformationsanteil aufgehoben ist.

4.4 Ionenabhängige Veränderungen im IR-Spektrum

Das sehr unterschiedliche Schmelzverhalten des K^+ - und des Mg^{2+} -Salzes der tRNA^{Phe} im UV läßt erwarten, daß sich einige der molekularen Grundlagen dieser Veränderung im IR-Spektrum äußern. Abb. 31 zeigt jedoch, daß dies im Bereich der Valenzschwingungen der Basen kaum zutrifft. Das Mg^{2+} -Salz unterscheidet sich vom K^+ -Salz nur dadurch, daß die Bande bei 1680 cm^{-1} etwas nach kleineren Wellenzahlen rückt und eine Schulter an ihrer großwellenzahligen Flanke erhält.

Deutliche Veränderungen im Spektrum treten erst dann auf, wenn man das K^+ -Salz der tRNA durch Dialyse gegen H_2O weitgehend von Ionen befreit. Das Aussehen des Bandenkomplexes zeigt, daß ein großer Teil der Basenpaarungen aufgebrochen ist. Ein Vergleich der Bandenlagen der Carbonylschwingungen

(Tab. 4, Abb. 32) zeigt, daß die gereinigte Probe eine Mittelstellung zwischen dem K^+ -Salz bei $20^\circ C$ und dem K^+ -Salz bei $55^\circ C$ einnimmt.

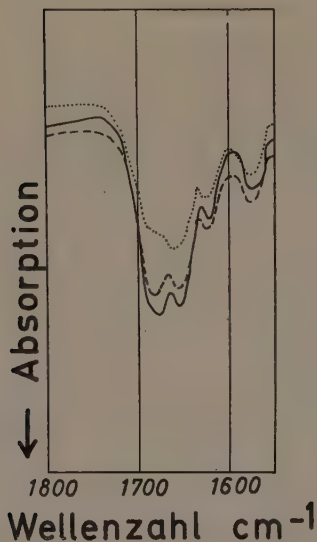


Abb. 31: IR-Spektren von tRNA^{Phe}
pH 6,8, D_2O
—— 0,01 n Mg^{2+}
----- 0,01 n K^+
..... 2x 12 h Dialyse gegen H_2O

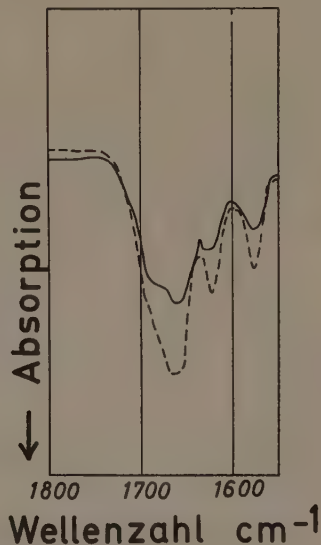


Abb. 32: IR-Spektren von tRNA^{Phe}
pH 6,8; D_2O
—— 2x 12 h Dialyse gegen H_2O
20°C
----- 0,01 n K^+ , 55°C

Der Befund, daß bei Ionenentzug die Sekundärstruktur zerstört wird, ist nicht überraschend und auch von anderen Nukleinsäuren bekannt. Grund ist die elektrostatische Abstoßung der nicht mehr genügend abgeschirmten, negativen Phosphatgruppen.

tRNA ^{Phe} , 0,01 n K ⁺ pH 6,8, D ₂ O, 20°C	1680 cm ⁻¹	1655 cm ⁻¹
tRNA ^{Phe} , gereinigt, D ₂ O (2x12 h Dialyse gegen H ₂ O)	1685 cm ⁻¹ starke Schulter	1660 cm ⁻¹
tRNA ^{Phe} , 0,01 n K ⁺ pH 6,8, D ₂ O, 55°C	1690 cm ⁻¹ schw. Schulter	1668 cm ⁻¹

Tabelle 4: Bandenlagen der Carbonylschwingungen von tRNA^{Phe}.

Unerwartet ist die Tatsache, daß die durch Mg²⁺-Ionen hervorgerufene Strukturänderung der tRNA^{Phe} sich nur sehr geringfügig in den Banden der Carbonylvalenzschwingungen zeigt. Dies führt zu dem Schluß, daß es lediglich eine Änderung der Tertiärstruktur ist, die sich nicht in den Valenzbanden der Basen äußert.

Anders wird sich die Sachlage im Bereich der Schwingungen des Zucker-Phosphat-Rückgrats darstellen. Abb. 33 zeigt zunächst die Verhältnisse in D₂O.

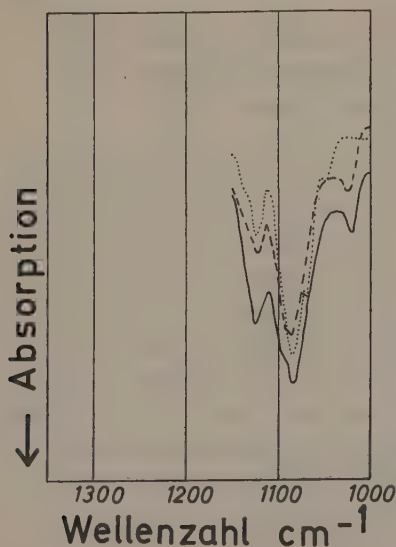


Abb. 33: IR-Spektren von tRNA^{Phe}
pH 6,8, D₂O, 20°C
—— 0,01 n Mg²⁺
----- 0,01 n K⁺
..... 2x12 h Dialyse g. H₂O

Hier kann man, wie in 3.2.5 diskutiert, an Hand der Bandenlagen der antisymmetrischen C-O-C-Valenzschwingung und der 2'-OD-Deformationsschwingung der Ribose beurteilen, ob diese beiden Schwingungen miteinander koppeln, was nur eintritt, wenn die beiden Gruppen über eine Wasserstoff-Brücken-Bindung miteinander verknüpft sind. Zur Verdeutlichung sind in Tabelle 5 die Bandenlagen der beiden diskutierten Schwingungen zusammengestellt.

	C-O-C-Valenzschwingung	2'-OD-Deformations- schwingung
0,01 n Mg^{2+}	maskiert durch symm. PO_2^- -Valenzbande (1084 cm^{-1}) Schulter bei 1096 cm^{-1}	1020 cm^{-1}
0,01 n K^+	maskiert durch symm. PO_2^- -Valenzbande (1085 cm^{-1})	1025 cm^{-1}
gereinigt	1072 cm^{-1}	1046 cm^{-1}

Tabelle 5: Bandenlagen von tRNA^{Phe} , $1100\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$, D_2O .

Abb. 33 und Tab. 5 zeigen, daß in der gereinigten Probe diese Wasserstoff-Brücke nicht ausgebildet wird, da die Banden beider Schwingungen in ihrer normalen Lage sind. Sowohl beim K^+ -Salz als auch beim Mg^{2+} -Salz ist sie jedoch ausgebildet, wobei die um 5 cm^{-1} nach kleineren Wellenzahlen verschobene Bande der 2'-OD-Deformationsschwingung zeigt, daß beim Mg^{2+} die Kopplung stärker ist als beim K^+ . Dafür spricht auch, daß an der kurzwelligen Flanke der symmetrischen PO_2^- -Valenzbande (1084 cm^{-1}) eine schwache Schulter bei 1096 cm^{-1} liegt. Dies könnte die um etwa 25 cm^{-1} zu größeren Wellenzahlen verschobene Bande der antisymmetrischen C-O-C-Valenzschwingung sein. Die verstärkte Kopplung zeigt, daß das Mg^{2+} eine stabilere und kompaktere Struktur des Rückgrats der tRNA^{Phe} induziert als das K^+ .

Weiterer Aufschluß über Tertiärstrukturänderungen, die sich in der Konformation des Rückgrats äußern, ist aus den Spektren in H_2O zu erwarten. Hier interessiert uns vor allem die Bande der antisymmetrischen PO_2^- -Valenzschwingung bei etwa 1235 cm^{-1} . Die Bandenlagen der Abb. 34 sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

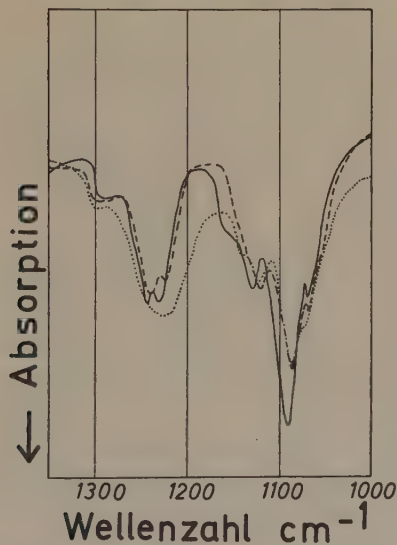


Abb. 34: IR-Spektren von tRNA^{Phe} ,
 pH 6,8, H_2O , 20°C
 ——— 0,01 n Mg^{2+}
 ----- 0,01 n K^+
 2x 12 h gegen H_2O dialysiert

0,01 n Mg^{2+}	1243 cm^{-1} und 1230 cm^{-1}
0,01 n K^+	1238 cm^{-1} und 1228 cm^{-1}
2x 12 h gegen H_2O dialysiert	1229 cm^{-1}

Tabelle 6: Bandenlagen der Abb. 34.

Aus Abb. 34 und Tab. 6 kann man entnehmen:

1. Bei der gereinigten Probe ist keine Aufspaltung der Bande zu beobachten.
2. Die Aufspaltung ist beim Mg^{2+} größer als beim K^+ .
3. Die Bandenlage verschiebt sich von der gereinigten Probe (1229 cm^{-1}) über das K^+ (1233 cm^{-1}) zum Mg^{2+} ($1236,5 \text{ cm}^{-1}$) zu höheren Wellenzahlen.

Die Aufspaltung, die man beim Mg^{2+} und beim K^+ beobachtet, hat ihren Grund vermutlich in einer Kopplung der antisymmetrischen PO_2^- -Valenzschwingung mit einer Schwingung mit 2'-OH-Deformationsanteil (siehe 3.2.5). Um koppeln zu können, müssen dazu die PO_2^- -Gruppen um eine Phosphoesterbindung zu den Basen hingedreht werden. Die größere Aufspaltung beim Mg^{2+} -Salz der tRNA zeigt, daß die Kopplung zwischen den beiden Schwingungen hier stärker ist als beim K^+ -Salz. Das kann seine Ursache nur darin haben, daß die durch die Drehung um die Phosphoesterbindung hervorgerufene Konformation des Rückgrats bei der Mg^{2+} -tRNA besser ausgebildet ist als bei der K^+ -tRNA. Dies zeigt sich auch in der beobachteten Verschiebung des Bandenkomplexes. Wenn diese Rückgratstruktur, bei der die Phosphatgruppen ja nach innen zu den Basen gedreht sind, sehr stabil und kompakt ist, können die Phosphatgruppen weniger mit dem Lösungsmittel wechselwirken. Bei schwächerer Hydratation bilden sich weniger Wasserstoff-Brücken-Bindungen aus, was die Bindungskonstante der Phosphatgruppe erhöht und die Bande ihrer Valenzschwingung nach größeren Wellenzahlen verschiebt. Dasselbe Phänomen beobachtete Zundel (76) bei Phosphinsäuren und Thiophosphonsäuren in Abhängigkeit von der Hydratation.

Interessant ist ein Vergleich dieser Ergebnisse mit Untersuchungen über die Zahl von Bindungsplätzen für Mg^{2+} und die Konstanten dieser Bindungen (73) (74). (77).

Häufig werden bei solchen Untersuchungen Mn^{2+} - anstelle von Mg^{2+} -Ionen verwendet. Cohn et al. (77) konnten jedoch zeigen, daß Mn^{2+} -Ionen die Mg^{2+} -Ionen bei den wichtigsten biologischen Funktionen vertreten können.

Alle Untersuchungen führen zu dem Ergebnis, daß es zwei verschiedene Arten von Bindungsplätzen gibt:

1. 3 bis 10 Mg^{2+} -Ionen werden stark gebunden.
2. 21 - 25 Mg^{2+} -Ionen werden schwächer gebunden.

Die allgemeine akzeptierte Anschauung ist die, daß die stark gebundenen Mg^{2+} -Ionen die biologisch aktive Tertiärstruktur induzieren, während die anderen elektrostatisch an die Phosphatgruppen gebunden sind. Dabei ist interessant, daß die Zahl der schwach gebundenen Ionen ziemlich genau der der Basenpaare in den tRNAs entspricht ($\text{tRNA}^{\text{Phe}} = 21$). Unter der Annahme, daß die schwach gebundenen Mg^{2+} -Ionen nur an die Phosphatgruppen im Rückgrat der basengepaarten Regionen gebunden werden, bedeutet das, daß nur an jede zweite Phosphatgruppe ein Mg^{2+} -Ion gebunden ist. Da nun aber, wie in diesem Kapitel gezeigt wurde, die Phosphatgruppen sich unter dem Einfluß der Ionen zu den Basen drehen, befinden sich die Mg^{2+} -Ionen zwischen diesen beiden Gruppen. Damit wird jeder zweite Basenrest durch das kleine, hochgeladene Mg^{2+} -Ion polarisiert, während die dazwischenliegenden Basen von den Phosphatgruppen in umgekehrter Richtung polarisiert werden. Dieser Effekt kann mit K^+ -Ionen nicht eintreten, da je 1 K^+ -Ion pro Phosphatgruppe gebunden wird. Durch diese Dipol-Dipol-Wechselwirkung der Basen in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen tritt eine zusätzliche Stabilisierung der basengepaarten Regionen ein. Außerdem wird dadurch die Kooperativität des Schmelzens bzw. der Bildung der helikalen Bereiche beträchtlich erhöht.

Diese beiden Befunde äußern sich in den UV-Schmelzkurven. In 4.2 wurde festgestellt, daß die Mg^{2+} -Ionen die Stabilität der Struktur erhöhen (Verschiebung des Schmelzpunkts zu höheren Temperaturen) und zusätzlich ihre Kooperativität beträchtlich vergrößern (die Schmelzkurve wird steiler).

Zum Schluß sei noch erwähnt, daß sich die besondere Konformation des Rückgrats in der Mg^{2+} -induzierten Tertiärstruktur auch in der Bande bei 1120 cm^{-1} äußert. Diese Bande wird einer antisymmetrischen Skelettschwingung der Ribose zugeordnet (51) und hat in Anwesenheit von Mg^{2+} eine andere Lage (1128 cm^{-1} gegenüber 1121 cm^{-1} beim K^{+} und in der gereinigten Probe) und zusätzlich eine starke Schulter bei größeren Wellenzahlen. Bis jetzt kann man allerdings noch keine Aussagen darüber machen, welche besondere Konformation der Ribose diese Veränderungen im Spektrum hervorruft.

5.0 Untersuchungen an 23S rRNA

5.1 Derzeitiger Wissensstand

Das Ribosom ist der Ort der Proteinsynthese in der lebenden Zelle. Das komplexe Organell kann sehr leicht reversibel in zwei Untereinheiten dissoziiert werden - z. B. durch niedrige Mg^{2+} -Konzentrationen -, die durch ihre Sedimentationskoeffizienten charakterisiert werden, und zwar als 30S bzw. 50 S Partikel (78). Jede dieser beiden Untereinheiten besteht nun aus einem Nukleinsäure- und einem Proteinanteil. Der 50S Partikel enthält zwei Nukleinsäuren, die 23S rRNA mit etwa 3200 Nukleotiden und die 5S rRNA mit 120 Nukleotiden und zusätzlich etwa 34 Proteine. Der 30S Partikel setzt sich aus der 16S rRNA und etwa 21 verschiedenen Proteinen zusammen. Mit verschiedenen Methoden hat man festgestellt, daß die meisten, wenn nicht gar alle der Proteine an der Oberfläche des Ribosoms liegen. Dasselbe gilt für die RNAs.

Aus grundlegenden Experimenten von Kurland (79) und Nomura et al. (80) weiß man, daß es gelingt, funktionsfähige 30S Untereinheiten aus ihren Bestandteilen - der Nukleinsäure und den Proteinen - aufzubauen. Nomura et al. (80) stellten fest, daß es sogenannte Strukturproteine gibt, die unbedingt zum Aufbau der Untereinheit benötigt werden, und sogenannte Funktionsproteine, die zur Aufrechterhaltung der biologischen Aktivität erforderlich sind. Ein überraschendes Ergebnis der Untersuchungen von Nomura et al. (80) war, daß einige Proteine nicht ständig an das Ribosom gebunden sind, sondern bei der Dissoziation in Untereinheiten abgespalten werden. Dabei ist interessant, daß auch unter physiologischen Bedingungen in vitro stets 10% der Ribosome in Untereinheiten dissoziiert sind (81). Der erste überzeugende Beweis, daß die Ribosome auch während der Proteinbiosynthese in Untereinheiten gespalten werden, gelang Kaempfer et al. (82) bei der Aufzucht von *E. coli* auf markierten und nichtmarkierten Nährböden.

Die spezifische Funktion der Untereinheiten konnte mittlerweile von Nomura et al. (83) - (85) geklärt werden, die zeigten, daß mit Virus RNA als messenger die Untereinheiten die Initiations-tRNA fMet stärker binden als die 70S Ribosome. Der zugrundeliegende Mechanismus ist inzwischen genau erforscht und bestätigt worden (86) - (88): mRNA und fMet binden zuerst an die kleine Untereinheit und bilden einen 30S Initiationskomplex; dieser Komplex verbindet sich dann mit der großen Untereinheit zu einem 70S Initiationskomplex; und wenn dieser Komplex fMet auf die erste Aminoacyl-tRNA überträgt, wird er zu einem polysomalen Ribosom.

Bei diesem Zyklus des Ribosoms spielen nun verschiedene Proteine eine wichtige Rolle (89) - (92). Einige von ihnen konnten isoliert werden, insbesondere die drei sogenannten Initiationsfaktoren F_1 , F_2 und DF. Untersuchungen von Eisenstadt et al. (91) - (93) zeigten, daß die Initiationsfaktoren nur an die native 30S Untereinheiten gebunden werden, nicht jedoch an die 50S oder 70S Fraktion. Dies ist ein Beweis dafür, daß diese Proteine nicht stets an das Ribosom gebunden sind, sondern einen eigenen Zyklus durchlaufen, in dessen Verlauf sie an die kleine Untereinheit gebunden werden und irgendwann bei der Bildung des polysomalen Ribosoms wieder freigesetzt werden. Ein Schema der Proteinsynthese, in dem diese Befunde berücksichtigt sind, zeigt Abb. 35 (94).

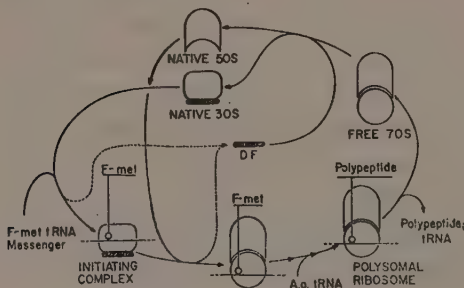


Abb. 35: Ribosom-Polysom-Zyklus nach (94).

Noch nicht geklärt ist die Frage, welche genaue Rolle die anderen Bausteine des Ribosoms im molekularen Geschehen der Proteinbiosynthese spielen. Es gibt Vermutungen (95) (96), daß Proteine nur dazu dienen, die biologisch aktive Struktur der RNA aufrecht zu erhalten. Es wurde des öfteren der Versuch unternommen, genauere Informationen über die Konformation der rRNAs im Ribosom und ohne Proteine zu erhalten. ORD-Untersuchungen und Röntgenkleinwinkelstreuung (97) (98) zeigen jedoch, daß die Sekundärstruktur im Ribosom und im proteinfreien Medium dieselbe ist. Auf einer Tertiärstruktur von proteinfreier rRNA deuten die Hydrolyseexperimente von Gould (99) hin.

Obwohl die rRNAs leichter zu isolieren sind als beispielsweise einzelne Spezies aus dem Gemisch der tRNAs und damit auch der Untersuchung leichter zugänglich, sind konkrete Aussagen über Sekundär- und Tertiärstruktur aufgrund des hohen Molekulargewichts nur sehr schwer möglich. Es ist daher nicht verwunderlich, daß es nur relativ wenige Untersuchungen auf diesem Gebiet gibt, die sich fast ausschließlich mit der Sekundärstruktur befassen.

Unumstritten ist, daß sich in den rRNAs Einzelstrangbereiche mit helikalen Doppelstrangbereichen ablösen (97) (100). Jenseitiger Aufschluß über die Sekundärstruktur brachte die Anwendung der Methoden von Thomas (57) (59) (66) (Kap. 4.1) auf die rRNAs. Seine Ergebnisse sind in Tabelle 7 wiedergegeben.

	16S	23S
(A+U)	24%	25%
(G+C)	36%	33%
A	12,5%	13%
U	9,5%	8,2%
G	13,5%	16,3%
C	4,5%	4,5%

Tabelle 7: rRNA-Basen im gepaarten und ungepaarten Zustand.

Mit einer anderen Methode (Oxidation mit Perphthalsäure) bestimmten Cramer und Erdmann (101) den Anteil an (A+U) Paaren in rRNA zu 20,4%. Von allen Adeninresten sind danach 43,5% basengepaart.

Ramanuntersuchungen von Thomas (100) über die Konformation des Rückgrats und die Stapelung der Basen brachten folgende Ergebnisse:

1. Die Konformation des Zucker-Phosphat-Rückgrats ändert sich, wenn die Basenpaarung durch Temperaturerhöhung zerstört wird.
2. Bei Temperaturerhöhung nimmt der Anteil der gestapelten Basen beim C und U ab, bleibt beim A gleich und nimmt beim G zu. Thomas nennt als mögliche Erklärung dafür, daß es gespannte Einzelstränge gibt, in denen G und A nicht stapeln können. Bei Temperaturerhöhung werden die Wechselwirkungen, die diese Spannung erzeugen, zerstört und ermöglichen damit eine vermehrte Stapelung der Purinbasen.

5.2 Ionenabhängige Veränderungen im IR-Spektrum

Ein wichtiges Ergebnis bei den Untersuchungen an der tRNA war, daß die Mg^{2+} induzierte Tertiärstruktur den Bereich der Basenschwingungen kaum beeinflusst und daher nicht Hand in Hand mit einer Sekundärstrukturänderung geht. Es ist nun die Frage, ob sich die 23S rRNA ähnlich verhält. Da die Ribosome ja eine spezifische Wechselwirkung mit den Mg^{2+} -Ionen eingehen, ist zu erwarten, daß diese in charakteristischer Weise das Spektrum der rRNA verändern. Ob dies nun, wie bei der tRNA^{Phe}, nur das Rückgrat betrifft, ist von großem Interesse.

Einen Hinweis darauf, daß die 23S rRNA sich anders verhält, gab Thomas (102) mit einer Ramanuntersuchung. Er fand, daß sich im Spektrum bei Zugabe von Mg^{2+} -Ionen sowohl im Bereich der Banden des Rückgrats als auch der Basen Veränderungen ergaben.

Abb. 36 zeigt zunächst die Verhältnisse im Bereich der Valenzschwingungen der Basen, deren Bandenlagen in Tabelle 8 zusammengestellt sind.

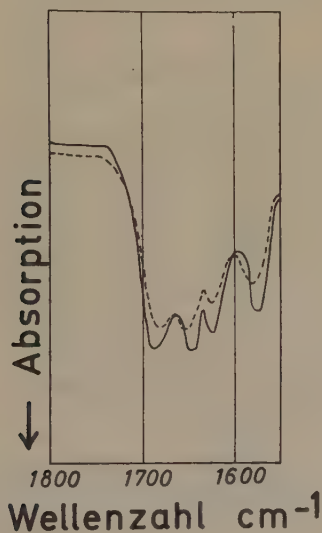


Abb. 36: IR-Spektren von 23S rRNA,
pH 6,8, D₂O, 20°C
— 0,01 n Mg²⁺ - - - - - 0,01 n K⁺

0,01 n Mg ²⁺	1687	1645	1625	1576
0,01 n K ⁺	1680	1653	1625	1578

Tabelle 8: Bandenlagen von 23S rRNA in cm⁻¹ (Bedingungen siehe Abb. 36)

Die Zuordnung der Schwingungen zu den Banden ist wie bei der tRNA^{Phe} (siehe Tabelle 3, Seite 50). Die beiden dominierenden Banden (1687 cm⁻¹ und 1645 cm⁻¹ beim Mg²⁺ und 1680 cm⁻¹ und 1653 cm⁻¹ beim K⁺) sind die Carbonylbanden der (G+C) Paare, die in der selben Art und Weise wie bei der tRNA andere Ringvalenzschwingungen verdecken. Die beiden Banden bei kleineren Wellenzahlen können weiteren Ringvalenzschwingungen zugeordnet werden.

Während sich die Lage der beiden letztgenannten Banden in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen nicht ändert, zeigen sich in den Banden der Valenzschwingungen der Carbonylgruppen signifikante Unterschiede:

1. Die Intensität der beiden Banden nimmt beträchtlich zu.
2. Der Abstand zwischen den beiden Banden vergrößert sich von 27 cm^{-1} beim K^+ auf 42 cm^{-1} beim Mg^{2+} .

Die Ursache des ersten Effekts kann nur sein, daß in Gegenwart vom Mg^{2+} -Ion die Zahl an (G+C) Paaren in der 23S rRNA zunimmt. Die Vergrößerung des Abstands zwischen den beiden Carbonylbanden zeigt, daß sich die Kopplung zwischen den zugehörigen Schwingungen verstärkt hat. Grund könnte eine engere räumliche Fixierung der beiden Gruppen sein, was den Schluß auf eine kompaktere Struktur der helikalen Bereiche zuließe.

Da nicht anzunehmen ist, daß sich bei Zugabe von Mg^{2+} -Ionen nur die Anzahl an (G+C) Paaren erhöht, sondern daß sich parallel auch zusätzliche (A+U) Paare bilden (was sich geringfügig in der Adeninbande bei 1576 cm^{-1} äußert), kann man folgende Schlüsse ziehen:

1. Mg^{2+} -Ionen induzieren vergrößerte oder mehr helikale Bereiche in der 23S rRNA.
2. Die helikalen Bereiche haben in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen eine kompaktere Struktur.

Es stellt sich nun sofort die Frage, ob sich diese beträchtlichen Änderungen der Konformation auch in Änderungen der Struktur des Rückgrats zeigen. Daß dies der Fall ist, kann man den Abbildungen 37 und 38 entnehmen.

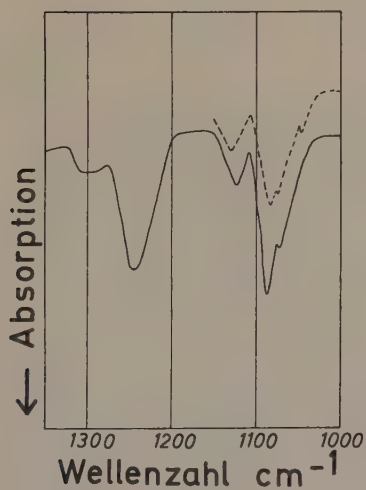
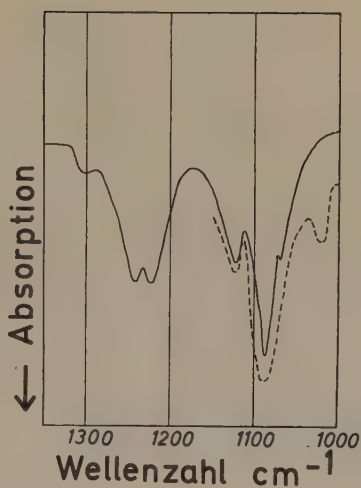
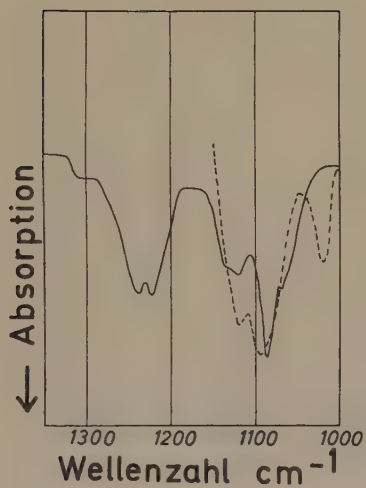


Abb. 37: IR-Spektren von 23S rRNA
pH 6,8, 20°C

oben links: 0,01 n Mg^{2+}

oben rechts: 0,01 n Ba^{2+}

unten: 0,01 n K^{+}

— H_2O - - - D_2O

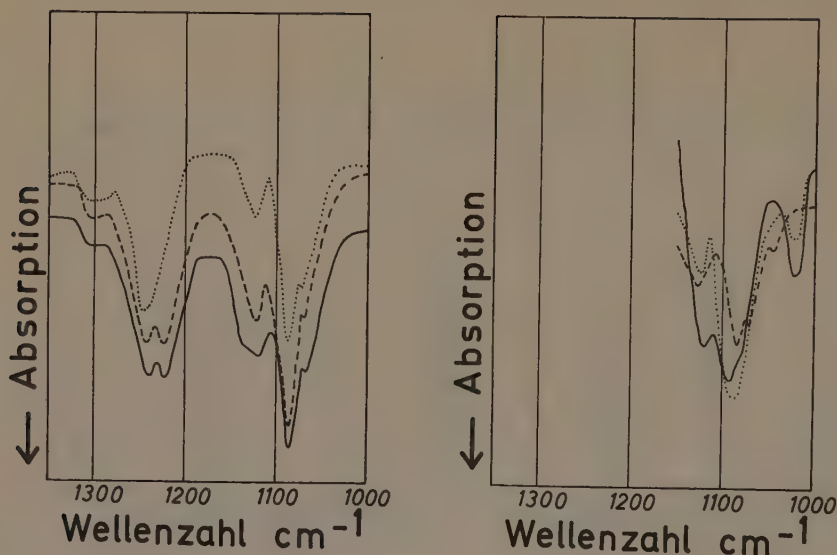


Abb. 38: IR-Spektren von 23S rRNA. pH 6,8, 20°C

links: H₂O rechts: D₂O

—— 0,01 n Mg²⁺ ----- 0,01 n Ba²⁺ 0,01 n K⁺

Zunächst zeigt Abb. 37 die Spektren bei Anwesenheit der verschiedenen Ionen im Vergleich der beiden Lösungsmittel. Dieser Darstellung kann man, wie in 3.2.5 ausführlich diskutiert, den Einfluß der 2'-OD-Gruppen der Ribose auf die Konformation des Rückgrats entnehmen. Sehr drastische Veränderungen beim Übergang von H₂O zu D₂O als Lösungsmittel treten beim Mg²⁺-Salz der rRNA auf, deutliche Unterschiede zeigt das Ba²⁺-Salz, während beim K⁺ die beiden Spektren bis auf eine schwache Bande bei 1047 cm⁻¹ (2'-OD-Deformationsschwingung) praktisch identisch sind. Die in Gegenwart von Mg²⁺ und Ba²⁺ zu beobachtende Bande bei 1022 cm⁻¹ ist die der durch Kopplung mit der antisymmetrischen C-O-C-Valenzschwingung zu kleineren Wellenzahlen verschobene 2'-OD-Deformationsschwingung. Diese Bande ist bei der Mg²⁺-rRNA außergewöhnlich intensiv (Abb. 38).

Außergewöhnlich ist auch die in diesem Fall zu beobachtende Intensität der Bande der symmetrischen PO_2^- -Valenzschwingung sowie ihre Lage (1095 cm^{-1}) und ihre Struktur (Schulter bei 1083 cm^{-1}). Alle diese Veränderungen hängen miteinander zusammen und haben ihre Ursache in einer ungewöhnlichen Stärke der Wasserstoff-Brücken-Bindungen von der 2'-OD-Gruppe der Ribose zur C-O-C-Gruppe des nächsten Ribosemoleküls. Durch diese relativ starke Brücke wird die Kopplung zwischen der 2'-OD-Deformationsschwingung und der antisymmetrischen C-O-C-Valenzschwingung relativ groß und außerdem erhöht sich die Polarität der an der Schwingung beteiligten Bindungen. Das erstere hat zur Folge, daß die Banden der diskutierten Schwingungen weit auseinander wandern und die erhöhte Polarität bedingt die Intensitätszunahme der zugehörigen Banden.

Das Maximum des Bandenkomplexes bei 1095 cm^{-1} ist deshalb in diesem Fall wohl der antisymmetrischen C-O-C-Valenzschwingung zuzuschreiben, während sich die symmetrische PO_2^- -Valenzschwingung nur als Schulter bei 1083 cm^{-1} äußert. Diese Interpretation wird dadurch bekräftigt, daß diese Bande in H_2O an derselben Stelle liegt (Abb. 37).

Zusammenfassend kann man feststellen: Beim Mg^{2+} -Salz der 23S rRNA ist die Wasserstoff-Brücke zwischen den 2'-OH- und den C-O-C-Gruppen der Ribosemoleküle kräftiger als in allen bisher beobachteten Fällen, während beim K^+ -Salz diese Brücke nicht ausgebildet wird.

In Gegenwart von Mg^{2+} und Ba^{2+} ist in H_2O auch die in 3.2.5 diskutierte Aufspaltung der antisymmetrischen PO_2^- -Valenzschwingungsbande zu beobachten (Abb. 38, Tab. 9), von der man weiß, daß sie in D_2O verschwunden ist (49). Dies bedeutet, daß sich in Gegenwart der zweiwertigen Kationen die vermutete Struktur des Rückgrates durch Verdrehung der PO_2^- gegen die CH_2 -Gruppen um eine Phosphoesterbindung ausgebildet hat.

0,01 n Mg^{2+}	1240 und 1222 cm^{-1}
0,01 n Ba^{2+}	1240 und 1221 cm^{-1}
0,01 n K^+	1245 cm^{-1}

Tabelle 9: Bandenlagen der antisymmetrischen PO_2^- -Valenzschwingung von 23S rRNA, 20°C, pH 6,8.

In dieser Struktur, die Kölkenbeck (23) im CPK-Kalottenmodell verwirklichen konnte (Abb. 18), liegen die Übergangsmomente der Phosphatschwingung und einer Schwingung mit 2'-OH-Deformationsanteil parallel und können somit koppeln. Daraus könnte die beobachtete Bandenaufspaltung resultieren. Die Kalottenmodelle zeigten außerdem, daß die beschriebenen Strukturmerkmale dem Rückgrat eine steife, helikale Konformation mit Rechtsschraubensinn geben. Es ist also denkbar, daß die Mg^{2+} -Ionen (und mit Einschränkung auch die Ba^{2+} -Ionen) in den ungepaarten Regionen der 23S rRNA diese Rückgratstruktur induzieren und daß sich dann Teile dieser bereits vorgebildeten Monohelices zusätzlich zu doppelhelikalen Bereichen zusammenlagern.

Die Reihenfolge dieser beiden Ereignisse im molekularen Geschehen muß natürlich nicht so sein, wie hier geschildert. Diese Frage könnte man nur mit Temperatursprungexperimenten klären. Es ist aber denkbar, daß den in den Carbonylbanden beobachteten Sekundärstrukturänderungen diese Konformationsänderung des Rückgrats vorausgeht.

Bisher nicht zu klären ist die Frage, warum in Gegenwart von K^+ die Bande der antisymmetrischen PO_2^- -Valenzschwingung zu größeren Wellenzahlen verschoben ist (Tabelle 8). Dieselbe, erstaunliche Beobachtung machte Lubos (22) an getrockneten Filmen DNA, rRNA und Poly C in Anwesenheit einwertiger bzw. zweiwertiger Kationen. Vergleichbar sind

auch die Ergebnisse von Leyte et al. (103) an trockenen Filmen von Polyacrylsäuresalzen, die besagen, daß in Gegenwart einwertiger Kationen die Bande der antisymmetrischen CO_2^- -Valenzschwingung zu größeren Wellenzahlen verschoben ist verglichen mit den zweiwertigen Kationen.

Im Vergleich mit der tRNA^{Phe} fällt auf, daß die Verschiebung der Phosphatbande dort in entgegengesetzter Richtung erfolgte und sie sich außerdem verbreiterte, was mit einer größeren Hydratation der Phosphatgruppe erklärt wurde. Die K^+ -Ionen haben also eine sehr charakteristische Wechselwirkung mit den Phosphatgruppen der 23S rRNA. Da die Bandenlage dieselbe ist, wie sie Lubos (22) in getrockneten Filmen beobachtete, hat es den Anschein, als verhinderten die K^+ -Ionen den Zutritt des Lösungsmittels zu den Phosphatgruppen. Eine mögliche Ursache dafür ist vielleicht in dem beträchtlichen Größenunterschied zwischen der tRNA und der rRNA zu suchen.

Abschließend sei auch hier darauf hingewiesen, daß die Bande einer Skelettschwingung einer Ribose bei etwa 1125 cm^{-1} , wie bei der tRNA^{Phe} auch, durch Mg^{2+} -Ionen eine charakteristische Änderung erfährt, deren Ursache in einer Konformationumwandlung des Zuckers zwischen einer exo- und einer endo-Form besteht. Die genaue Zuordnung dieser verschiedenen Zustände zu den beobachtbaren Veränderungen in den Banden ist aber zur Zeit noch nicht möglich. Hierzu sind Schwingungsberechnungen für die verschiedenen Konformationen notwendig, die augenblicklich durchgeführt werden.

5.3 Temperaturabhängige Veränderungen im IR-Spektrum

Die Interpretation der Spektren der Abbildungen 39, 40 und 41 lehnt sich eng an die sehr ähnlichen Ergebnisse bei der tRNA^{Phe} an. Deshalb seien hier nur noch kurz die Befunde und ihre Interpretation zusammengestellt.

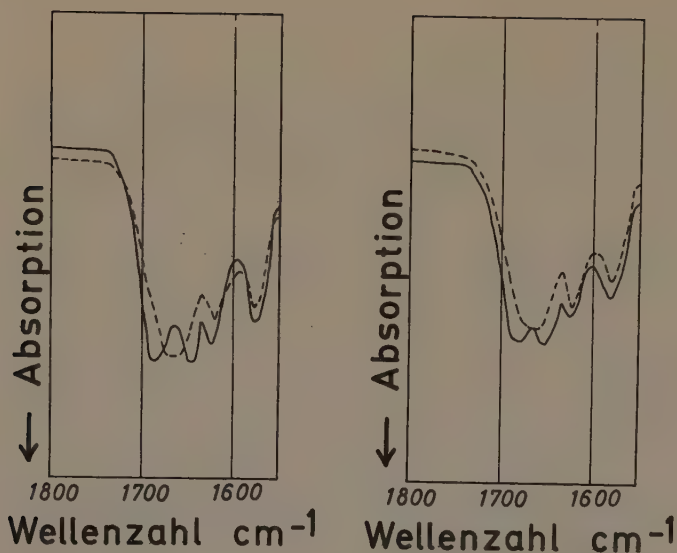


Abb. 39: IR-Spektren von 23S rRNA, pH 6,8, D₂O

links: 0,01 n Mg²⁺ rechts: 0,01 n K⁺

————— 20°C

----- 50°C

Zu Abb. 39:

	20°C	50°C	
0,01 n Mg ²⁺	1687, 1645	1665	Carbonylschwingungen
			
	1625, 1576	1622, 1576	Ringvalenzschwingungen
0,01 n K ⁺	1680, 1653	1665	Carbonylschwingungen
			
	1625, 1579	1623, 1578	Ringvalenzschwingungen

Tabelle 10: Bandenlagen der Abb. 39 in cm⁻¹.

Bei Temperaturerhöhung treten Veränderungen im Bereich der Carbonylvalenzbanden auf. Man beobachtet vor allem das Schmelzen der (G+C)-Paare (44). In der entstehenden random coil sind die Übergangsmomente der Schwingungen der Carbonylgruppen von G und C nicht mehr so orientiert, daß sie koppeln können. Die Schwingungen fallen daher zusammen.

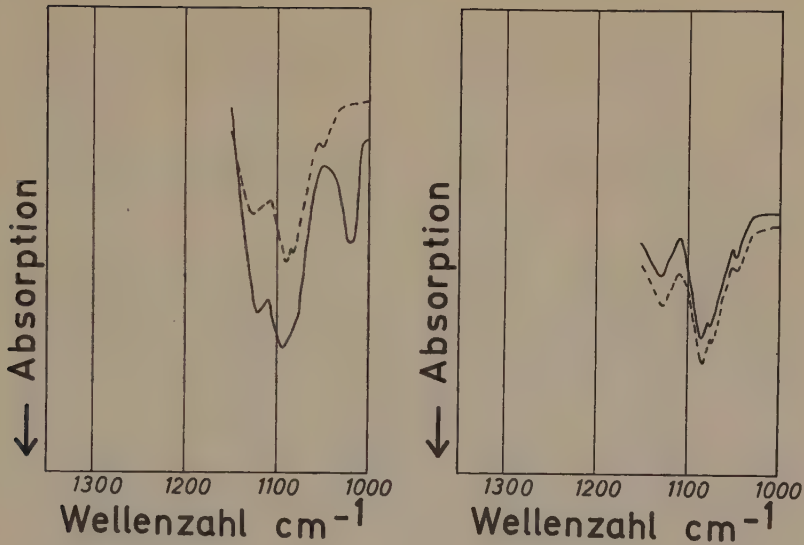


Abb. 40: IR-Spektren von 23S rRNA, pH 6,8, D₂O

links: 0,01 n Mg²⁺ rechts: 0,01 n K⁺

———— 20°C - - - - - 50°C

Zu Abb. 40:

	20°C	50°C	
0,01 n Mg ²⁺	1119	1125	Riboseskelettschwingung
	1083	1087	sym. PO ₂ ⁻ -Valenzschwingung
	1095	1078	C-O-C-Valenzschwingung antisymmetrisch
	1022	1048	2'-OD-Deformationsschwingung
0,01 n K ⁺	1129	1127	Riboseskelettschwingung
	1084	1083	sym. PO ₂ ⁻ -Valenzschwingung
	1075	1073	C-O-C-Valenzschwingung antisymmetrisch
	1047	1047	2'-OD-Deformationsschwingung

Tabelle 11: Bandenlagen der Abb. 40 in cm⁻¹.

Beim K^+ -Salz treten bei Temperaturerhöhungen im Spektrum keine Veränderungen auf, d. h. keine Konformationsumwandlung im Rückgrat.

Bei der Mg^{2+} -rRNA zeigen sich die folgenden, temperaturabhängigen Unterschiede.

1. Die Bande der 2'-OD-Deformationsschwingung verschiebt sich zu größeren Wellenzahlen (1022 nach 1048 cm^{-1})
2. Die Bande der antisymmetrischen C-O-C-Valenzschwingung der Ribose verschiebt sich zu kleineren Wellenzahlen.
3. Beide Banden verlieren an Intensität.

Dies bedeutet, daß die Wasserstoff-Brücke zwischen der 2'-OH-Gruppe und der Ribose - Äthergruppierungen zerstört wird, dadurch die Kopplung zwischen den hier beobachtbaren Schwingungen dieser beiden Gruppen aufgehoben wird, wodurch sich ihre Banden in ihre normale Lage verschieben. Außerdem geht die erhöhte Polarität der beiden schwingenden Gruppen verloren, wodurch die zugehörigen Banden an Intensität verlieren.

Zu Abb. 41:

	20°C	50°C
0,01 n Mg^{2+}	1240 und 1222	1237
0,01 n Ba^{2+}	1240 und 1221	1236
0,01 n K^+	1244	1245

Tabelle 12: Bandenlagen im Bereich der antisymmetrischen PO_2^- -Valenzschwingung von 23S rRNA (in H_2O) (Abb 41)

Bei Anwesenheit von K^+ -Ionen treten bei Temperaturerhöhung keine Veränderungen im Spektrum auf.

Beim Mg^{2+} (Ba^{2+})-Salz zeigen sich folgende temperaturabhängige Unterschiede:

1. Die Aufspaltung der antisymmetrischen PO_2^- -Valenzbande verschwindet.
2. Die Bande verschiebt sich zu höheren Wellenzahlen.

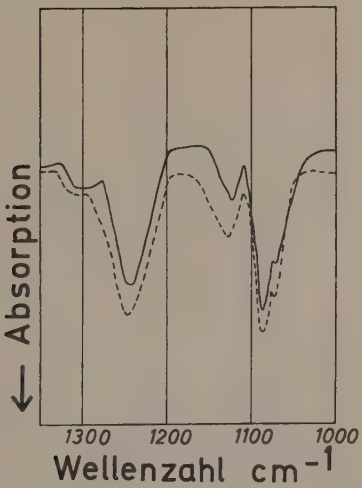
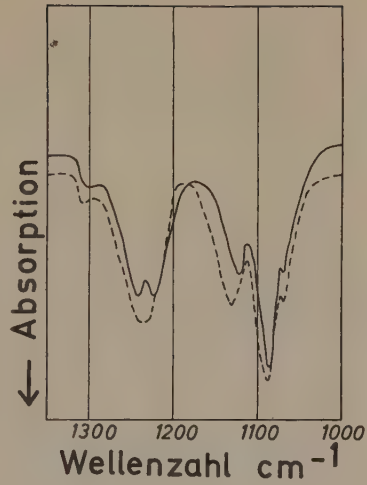
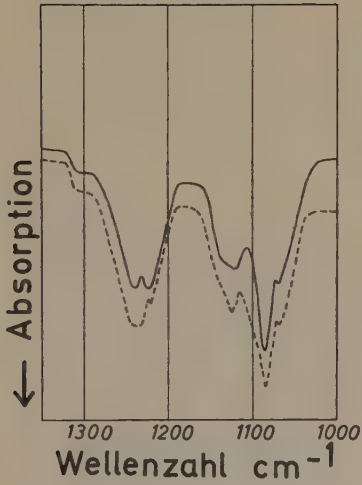


Abb. 41: IR-Spektren von 23S rRNA,
pH 6,8, H_2O

oben links: 0,01 n Mg^{2+}

oben rechts: 0,01 n Ba^{2+}

unten: 0,01 n K^{+}

———— 20°C - - - - - 50°C

Im ersten Befund äußert sich die Zerstörung der vermuteten Sekundärstruktur, die durch Drehung der Phosphatgruppen zu den Basenresten hin entsteht. Durch die Konformationsumwandlung wird die Kopplung zwischen der antisymmetrischen PO_2^- -Valenzschwingung und einer Schwingung mit 2'-OH-Deformationsanteil aufgehoben.

Die Verschiebung zu größeren Wellenzahlen ist umgekehrt wie bei der tRNA^{Phe} , wo sich die Bande zu kleineren verschiebt. Der Grund dafür ist mit den vorliegenden Ergebnissen nicht zu erklären. Erstaunlich ist, daß die Lage der Bande in geschmolzenem Zustand ähnlich ist wie in getrockneten Filmen (22). Sicher hat der beträchtliche Unterschied in der Größe der beiden Moleküle einen Einfluß. Bemerkenswert ist, daß auch im ungeordneten Zustand bei 50°C die Bande in Gegenwart von K^+ -Ionen bei größeren Wellenzahlen liegt als in Gegenwart von Mg^{2+} und Ba^{2+} (Tab. 12). Es scheint, als würden die K^+ -Ionen auch im Knäuel den H_2O -Molekülen den Zutritt zu den Phosphatgruppen verwehren.

6.0 Zusammenfassung

Ausgehend von der Tatsache, daß die Nukleinsäuren in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern (Ionenmilieu und Ionenstärke, Temperatur, pH) ihre Sekundär- und Tertiärstruktur ändern, wurden ihre IR-Spektren unter Variation zweier dieser Parameter (Ionenmilieu, Temperatur) aufgenommen.

I. Experimentelles

- a. Eine sinnvolle Diskussion ist nur möglich, wenn man von reinem, molekular einheitlichem Material ausgeht. Deshalb wurde tRNA^{Phe} aus dem Gemisch der tRNAs aus Hefe durch Säulenchromatographie an BD-Cellulose isoliert.
- b. Um die biologische Relevanz der Aussagen zu erhöhen, wurde in relativ verdünnten (3 mg/ml), gepufferten Systemen gemessen. Die dafür erforderliche Küvette mit großer (50 μ), konstanter Schichtdicke wurde konstruiert.
- c. Wegen der starken Lösungsmittelabsorption war eine Messung über den gesamten IR-Spektralbereich nicht möglich. Zugänglich waren jedoch der Bereich der Valenzschwingungen der Basen (in D₂O) und der Bereich der Valenzschwingungen des Rückgrats (in H₂O und D₂O).
- d. Bei Messungen in Abhängigkeit von der Temperatur war eine genaue Kenntnis dieser Größe notwendig. Sie wurde mit einem Pt-Widerstandfühler am Ort der Probe kontrolliert.
- e. Um die genauen Schmelzpunkte zu bestimmen, wurden UV-Schmelzkurven von tRNA^{Phe} und Poly (U) unter exakt denselben Bedingungen wie bei der IR-Messung aufgenommen.

II. Ergebnisse

1. Poly (U)

- a. Die vom Mg^{2+} -Poly (U) bei tiefen Temperaturen gebildete Sekundärstruktur ist vermutlich eine intramolekulare Tripelhelix. Diesen Schluß kann man aus Veränderungen an den Banden der Carbonylvalenzschwingungen ziehen.
- b. Bei dieser Sekundärstrukturbildung entsteht im Rückgrat eine Wasserstoff-Brücken-Bindung zwischen den 2'-OH-Gruppen und den Äthersauerstoffatomen benachbarter Ribosemoleküle. Außerdem drehen sich die Phosphatgruppen vermutlich zu den Basenresten.
- c. Beim Li^+ -Poly (U) bildet sich ebenfalls die in 1b beschriebene Wasserstoff-Brücken-Bindung im Rückgrat. Außerdem verändern sich die Banden der symmetrischen PO_2^- - und O-P-O-Valenzschwingung.

2. tRNA^{Phe}

- a. Die Kooperativität des Schmelzvorgangs und die Stabilität der Struktur von tRNA^{Phe} werden in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen beträchtlich erhöht.
- b. Eine besondere Struktur der Mg^{2+} -tRNA^{Phe} zeigt sich nur im Rückgrat: Eine Wasserstoff-Brücken-Bindung des in II.1.b beschriebenen Typs und ausserdem die vermutete Drehung der Phosphatgruppen. Im Bereich der Carbonylvalenzschwingungen sind keine wesentlichen Unterschiede zwischen dem Mg^{2+} - und dem K^+ -Salz. In Gegenwart von Mg^{2+} tritt also nur eine Änderung der Tertiärstruktur ohne Einfluß auf die Sekundärstruktur ein.
- c. Das Schmelzen der Sekundärstruktur von tRNA^{Phe} im Bereich der Valenzschwingungen der Basen läßt sich nur in der Zerstörung der (G+C)-Basenpaarungen beobachten. Parallel ändern sich die Konformationen des Rückgrats.

- d. Es wird ein Mechanismus des kooperativen Schmelzvorgangs diskutiert, der die Vermutung, daß in den helikalen Bereichen der tRNA^{Phe} nur an jede zweite Phosphatgruppe ein Mg^{2+} -Ion gebunden wird, mit dem Befund verbindet, daß diese Phosphatgruppen zu den Basenresten hin gedreht sind.

3. 23S rRNA

- a. Mg^{2+} -Ionen vermehren oder vergrößern die doppelhelikalen Bereiche, deren Struktur außerdem kompakter wird.
- b. Das Schmelzen der doppelhelikalen Bereiche läßt sich im Bereich der Valenzschwingungen der Basen auch hier nur in der Zerstörung der (G+C)-Basenpaarungen beobachten.
- c. Mg^{2+} und Ba^{2+} induzieren die in II.1.b erklärten Konformationen des Rückgrats. In Gegenwart von Mg^{2+} wird die Wasserstoff-Brücken-Bindung zwischen der 2'-OH-Gruppe und dem Äthersauerstoff zweier benachbarter Ribosemoleküle stärker als in allen bisherigen beobachteten Fällen.
- d. Diese Strukturmerkmale des Rückgrats verschwinden bei Temperaturerhöhung.
- e. Die physiologisch wichtigen Mg^{2+} -Ionen verändern also bei der 23S rRNA beträchtlich die Sekundärstruktur im Gegensatz zur tRNA^{Phe} .

Literatur

- (1) J.D.Watson: Abstracts of Proceedings of the Sixth Internat.Congress of Biochemistry, New York, I.S. 15 (1964)
- (2) W.E.C.Wacker: Ann.N.Y.Acad.Sci. 162, 717 (1969)
- (3) R.Thomas: Biochim.Biophys.Acta 14, 231 (1954)
- (4) W.F.Dove und N.Davidson: J.Mol.Biol. 5, 467 (1962)
- (5) F.C.Chao: Arch.Biochem.Biophys. 70, 426 (1957)
- (6) A.Tissières, J.D.Watson, D.Schlesinger und B.R.Hollingsworth: J.Mol.Biol. 1, 221 (1959)
- (7) P.O.P.Ts'o, J.Bonner und J.Vinograd: Biochim.Biophys. Acta 30, 570 (1958)
- (8) I.S.Edelmann, P.O.P.Ts'o und J.Vinograd: Biochim.Biophys.Acta 43, 393 (1960)
- (9) M.L.Petermann und M.G.Hamilton: In Protein Biosynthesis, ed. von R.J.C.Harris, S. 233, New York, Academic Press (1961)
- (10) T.Lindahl, A.Adams und J.R.Fresco: Proc.Nat.Acad.Sci. Wash. 55, 941 (1966)
- (11) D.B.Millar und R.W.Byrne: Arch.Biochem.Biophys. 119, 398 (1967)
- (12) D.Bell und G.J.Russell: Biochemistry 6, 1903 (1967)
- (13) W.Szer: Biochem.Biophys.Res.Comm. 20, 182 (1965)
- (14) J.Shack, R.J.Jenkins und J.M.Thompsett: J.Biol.Chem. 203, 373 (1953)
- (15) G.Zubay und P.Doty: Biochim.Biophys.Acta 29, 47 (1958)
- (16) G.Felsenfeld und S.Huang: Biochim.Biophys.Acta 34, 234 (1959)
- (17) R.Römer, D.Riesner, S.M.Coutts und G.Maass: Eur.J.Biochem. 15, 77 (1970)
- (18) Y.Kyogoku, M.Tsuboi, T.Shimanouchi und J.Watanabe: Nature 189, 120 (1961)
- (19) T.Shimanouchi, M.Tsuboi und Y.Kyogoku in: Advances in Chemical Physics, J.Duchesne Ed., VII, S. 435, Interscience Publ., New York (1964)

- (21) H.Fritsche: Z.Chem. 12, 1 (1972)
- (22) W.D.Lubos: Dissertation, Universität München 1970
- (23) K.Kölkenbeck: Dissertation, Universität München 1972
- (24) J.Tschirgadze, M.Sche und I.Charitononkov: Dokladi Akademii Nauk. SSSR, Biophysika 203, 959 (1972)
- (25) R.W.Holley und S.H.Merrill: J.Amer.Chem.Soc. 81, 753 (1959)
- (26) H.G.Zachau, M.Tada, W.B.Lawson und M.Schweiger: Biochim. Biophys. Acta 53, 221 (1961)
- (27) P.B.Doctor und C.M.Conelly: Biochem.Biophys.Res.Comm. 6, 201 (1961)
- (28) J.Gillam, S.Millward, D.Blew, M.von Tigerstrom, E.Wimmer und G.M.Tener: Biochemistry 6, 3043 (1967)
- (29) U.L.RajBhandary, S.H.Chang, A.Stuart, R.D.Faulkner, R.M.Hoskinson und H.G.Khorana: Proc.Natl.Acad.Sci. USA 57, 751 (1967)
- (30) D.Riesner: Dissertation, Technische Universität Braunschweig 1970
- (31) K.P.Hofmann und G.Zindel: Z.Naturforschg. C im Druck
- (32) K.P.Hofmann: Dissertation, Universität München 1972
- (33) I.Kampschulte-Scheuing: Dissertation, Universität München 1969
- (34) E.G.Richards, C.P.Flessel und J.R.Fresco: Biopolymers 1, 431 (1963)
- (35) E.W.Small und W.L.Peticolas: Biopolymers 10, 69 (1971)
- (36) W.Szer und S.Ochoa: J.Mol.Biol. 8, 823 (1964)
- (37) W.Szer: J.Mol.Biol. 16, 585 (1966)
- (38) J.C.Thrierr, M.Dourlent und M.Leng: J.Mol.Biol. 58, 815 (1971)
- (39) A.M.Willemsen und G.A.J.Van Os: Biopolymers 10, 945 (1971)
- (40) A.Rabczenko und D.Shugar: Acta Biochim.Pol. 18, 387 (1971)
- (41) D.Bode, M.Heinecke und U.Schernau: Biochem.Biophys. Res.Comm. 52, 1234 (1973)
- (42) B.Zmudzka und D.Shugar: Febs Letters 8, 52 (1970)

- (43) H.T.Miles: Proc.Nat.Acad.Sci. 51, 1104 (1964)
- (44) F.B.Howard, J.Frazier und H.T.Miles: Proc.Nat.Acad. Sci. 64, 451 (1969)
- (45) S.Arnott und P.J.Bond: Nature New Biology 244, 99 (1973)
- (46) A.Rich und F.H.C.Crick: Nature 176, 915 (1955)
- (47) P.M.Cowan, S.McGavin und A.C.T.North: Nature 176, 1062 (1955)
- (48) G.N.Ramachandran: Nature 177, 710 (1956)
- (49) K.Kölkenbeck und G.Zundel: in Vorbereitung
- (50) M.Tsuboi: J.Polymer.Sci.C 7, 125 (1963)
- (51) M.Tsuboi, M.Matsuo, M.Shimanouchi und Y.Kyogoku: Spectrochim.Acta 19, 1617 (1963)
- (52) L.J.Bellamy: The Infra-Red Spectra of Complex Molecules, 2end Ed., Methuen, London (1958)
- (53) K.Nakanishi, N.Furutachi, M.Funamizu, D.Grunberger und J.B.Weinstein: J.Amer.Chem.Soc. 92, 7617 (1970)
- (54) R.W.Holley, J.Apgar, G.A.Everett, J.T.Madison, M.Marquisee, S.H.Merrill, J.R.Penswick und A.Zamir: Science (Washington) 147, 1462 (1965)
- (55) H.G.Zachau, D.Dütting und H.Feldmann: Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 347, 212 (1966)
- (56) D.Riesner, R.Römer und G.Maass: Biochem.Biophys.Res. Comm. 35, 369 (1969)
- (57) G.J.Thomas, Jr.: Biopolymers 7, 325 (1969)
- (58) G.J.Thomas, Jr., G.C.Medeiros und K.A.Hartmann: Biochim. Biophys.Acta 277, 71 (1972)
- (59) G.J.Thomas, Jr., M.C.Chen und K.A.Hartmann: Biochim. Biophys.Acta 324, 37 (1973)
- (60) R.Thiede und H.G.Zachau: Biochim.Biophys.Acta 217, 294 (1970)
- (61) T.Igo-Kemenes und H.G.Zachau: Eur.J.Biochem. 18, 292 (1971)
- (62) R.G.Streeck und H.G.Zachau: Febs Letters 13, 329 (1971)
- (63) H.G.Zachau: Angewandte Chemie 81, 545 (1969)
- (64) M.Yoshida und T.Utika: Biochim.Biophys.Acta 157, 466 (1968)

- (65) D.Riesner, R.Römer und G.Maass: Eur.J.Biochem. 15, 85 (1970)
- (66) G.J.Thomas, Jr. und K.A.Hartmann: Biochim.Biophys. Acta 312, 311 (1973)
- (67) M.Yaniv, A.Favre und B.G.Barrell: Nature 223, 1331 (1969)
- (68) K.Beardsley und C.R.Cantor: Proc.Nat.Acad.Sci. 65, 39 (1970)
- (69) S.H.Kim, G.J.Quigley, F.L.Suddath, A.McPherson, D.Snedden, J.J.Kim, J.Weinzierl, P.Blattmann und A.Rich: Proc.Nat.Acad.Sci. USA 69, 374 (1972)
- (70) S.H.Kim, G.J.Quigley, F.L.Suddath, A.McPherson, D.Snedden, J.J.Kim, J.Weinzierl und A.Rich: Science 179, 285 (1973)
- (71) D.J.Abraham: J.theor.Biol. 30, 83 (1971)
- (72) J.Ninio, A.Favre und M.Yaniv: Nature 223, 1333 (1969)
- (73) G.E.Willick und C.M.Kay: Biochemistry 10, 2216 (1971)
- (74) A.Danchin und M.Gueron: Eur.J.Biochem. 16, 532 (1970)
- (75) N.N.Aylward: J.Chem.Soc. B 1967, 401
- (76) G.Zundel: "Hydration and Intermolecular Interaction"; Academic Press, New York 1969
- (77) M.Cohn, A.Danchin und M.Grunberg-Manago: J.Mol.Biol. 39, 199 (1969)
- (78) H.Maruta, S.Natori und D.Mizuno: J.Mol.Biol. 46, 513 (1969)
- (79) C.G.Kurland: Ann.Rev.Biochem. 41, 377 (1972)
- (80) M.Nomura, S.Mizushima, M.Ozaka, P.Traub und C.V.Lowry: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology XXXIV, 49 (1969)
- (81) G.Green und B.D.Hall: Biophys.J. 1, 517 (1961)
- (82) R.O.R.Kaempfer, H.Meselson und H.J.Raskas: J.Mol.Biol. 31, 277 (1968)
- (83) M.Nomura und C.V.Lowry: Proc.Nat.Acad.Sci.USA 52, 946 (1967)

- (84) M.Nomura, C.V.Lowry und C.Guthrie: Proc.Nat.Acad. Sci. USA 58, 1487 (1967)
- (85) C.Guthrie und M.Nomura: Nature 219, 232 (1968)
- (86) S.Ochoa: Naturwissenschaften 55, 505 (1968)
- (87) P.Lengyel und D.Soll: Bact.Revs. 33, 264 (1969)
- (88) M.Nomura: Bact.Revs. 34, 228 (1970)
- (89) W.M.Stanley, Jr., M.Salas, A.J.Wahba und S.Ochoa: Proc.Nat.Acad.Sci. USA 56, 290 (1966)
- (90) M.Revel und F.Gros: Biochem.Biophys.Res.Comm. 25, 124 (1966)
- (91) J.Eisenstadt und G.Brawerman: Biochemistry 5, 2777 (1966)
- (92) J.Eisenstadt und G.Brawerman: Proc.Nat.Acad.Sci. USA 58, 1560 (1967)
- (93) R.Parenti-Rosina, A.Eisenstadt und J.Eisenstadt: Nature 221, 363 (1969)
- (94) A.R.Subramanian, E.Z.Ron und B.D.Davis: Proc.Nat. Acad.Sci. USA 61, 761 (1968)
- (95) P.S.Sypherd und B.Fansler: J.Bact. 93, 920 (1967)
- (96) P.S.Sypherd: J.Mol.Biol. 56, 311 (1971)
- (97) A.S.Spirin und L.P.Gavrilova: The Ribosome, Springer-Verlag, New York (1969)
- (98) A.Klug, K.C.Holmes und J.T.Finch: J.Mol.Biol. 3, 87 (1961)
- (99) H.Gould: Biochemistry 5, 1103 (1966)
- (100) G.J.Thomas, Jr. und M.Spencer: Biochim.Biophys.Acta 179, 360 (1969)
- (101) F.Cramer und V.A.Erdmann: Nature 218, 92 (1968)
- (102) G.J.Thomas, Jr.: Biochim.Biophys.Acta 213, 417 (1970)
- (103) J.C.Leyte, L.Zuiderweg und H.J.Vledder: Spectrochim-Acta 23A, 1397 (1967)

Lebenslauf

Am 22.8.1945 wurde ich in Kirchanschöring/Obb. geboren. Meine Eltern sind Dr. Rudolf Herbeck, Chemiker, und seine Frau Viktoria, geborene Bux. Ich bin das einzige Kind meiner Eltern.

In den Jahren 1952 bis 1956 besuchte ich die Volksschule in Kirchheim/Weinstraße. Danach trat ich in das Neusprachliche Gymnasium in Frankenthal ein und wechselte 1957 an das Leininger Gymnasium in Grünstadt. Dort legte ich 1965 meine Reifeprüfung ab.

1965 bis 1968 studierte ich Chemie an der Universität Mainz bis zur Diplomchemiker-Vorprüfung und wechselte dann an die Universität München. Nach der mündlichen Diplomprüfung im Juli 1970 begann ich am Physikalisch-Chemischen Institut unter der Leitung von Dr. G. Zundel mit der vorliegenden Arbeit.

Seit September 1970 bin ich mit Fräulein Michaela Brem verheiratet.

